

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN
DER PHOTOCHEMIE
VON FREIEN BILIVERDINEN
UND PHYCOCYANIN MIT Z/E-
KONFIGURIERTEN CHROMOPHOREN
ZUR PHYTOCHROMUMWANDLUNG**

Gabriele B. Schmidt

Disbui. München

1988

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN DER PHOTOCHEMIE
VON FREIEN BILIVERDINEN
UND PHYCOCYANIN MIT
Z/E- KONFIGURIERTEN CHROMOPHOREN
ZUR PHYTOCHROMUMWANDLUNG

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereiches Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Gabriele B. Schmidt
aus
Germering

Mai 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Scheer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger

Tag der mündlichen Prüfung: 3.8.1988

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

Für meine Eltern

Der hochachtungsvolle Brief, den Sie am 1. März 1900 an mich sandten, ist mir heute erst gekommen. Ich habe ihn sofort gelesen und bin sehr dankbar für die vielen guten Ratschläge, die Sie mir darin gegeben haben. Ich werde mich an dieselben halten und hoffe, dass Sie mir damit sehr nützlich sein werden.

Ich habe auch schon einige Male mit Ihnen gesprochen, aber Sie sind so beschäftigt, dass Sie nicht viel Zeit haben können. Ich werde mich an die Ratschläge halten, die Sie mir gegeben haben, und hoffe, dass Sie mir damit sehr nützlich sein werden.

Ich habe auch schon einige Male mit Ihnen gesprochen, aber Sie sind so beschäftigt, dass Sie nicht viel Zeit haben können. Ich werde mich an die Ratschläge halten, die Sie mir gegeben haben, und hoffe, dass Sie mir damit sehr nützlich sein werden.

Ich habe auch schon einige Male mit Ihnen gesprochen, aber Sie sind so beschäftigt, dass Sie nicht viel Zeit haben können. Ich werde mich an die Ratschläge halten, die Sie mir gegeben haben, und hoffe, dass Sie mir damit sehr nützlich sein werden.

Ich habe auch schon einige Male mit Ihnen gesprochen, aber Sie sind so beschäftigt, dass Sie nicht viel Zeit haben können. Ich werde mich an die Ratschläge halten, die Sie mir gegeben haben, und hoffe, dass Sie mir damit sehr nützlich sein werden.

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Phytochemie des Botanischen Instituts der Ludwig-Maximilians Universität München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Scheer angefertigt.

Herrn Prof. Scheer gilt mein besonderer Dank für die freundliche Unterstützung der Arbeit und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. F. Siebert am Institut für Biophysik und Strahlenbiologie der Universität Freiburg im Brsg. für Aufnahme und Interpretation der FT- IR Spektren, sowie Herrn Dr. E. Cmiel an der TU München/Garching für die Aufnahme von ¹H-NMR-Spektren.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dipl. Biol. S. Siebzezhnrübl für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei Durchführung der Untersuchungen zur Photochemie von Phycocyanin, sowie bei Herrn Dipl. Biol. R. Fischer für Überlassung von gereinigten Phycocyanin- Untereinheiten.

Dank gebührt auch Fr. C. Bubenzer, Fr. I. Katheder und Fr. T. Neuner für ihre wertvolle technische Unterstützung.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Schmidt, G., S. Siebzehnrübl, R. Fischer, H. Scheer,
T. Schirmer, W. Bode, R. Huber (1987):
ZZE- Configuration of Chromophore β -153* in C- Phycocyanin
from *Mastigocladus laminosus*.
Z. Naturforsch. 42c, 845.

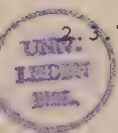
Schmidt, G., S. Siebzehnrübl, R. Fischer, H. Scheer (1988):
Chromophore Modifications in C-Phycocyanin from *Mastigocla-*
dus laminosus.
Tagungsbericht: Second European Conference on the Spectros-
copy of Biological Molecules, J. Wiley and Sons Ltd., GB; im
Druck.

Schmidt, G., S. Siebzehnrübl, R. Fischer, H. Scheer (1988):
Photochromic Properties of C-Phycocyanin.
In: Photosynthetic Light-Harvesting Systems, H. Scheer, S.
Schneider (Hrsgb.), de Gruyter Verlag, Berlin, New York.

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	10
1. Vorkommen und Bedeutung offenkettiger Tetrapyrrole	10
2. Photochemische Reaktionen und ihre physiologischen Auswirkungen	11
2.1 Bilirubin	11
2.2 Phytochrom	12
2.3 Phycocyanin	14
2.4 Phycochrom	15
3. Ziel dieser Arbeit	16
B. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	18
1. <u>Cis/Trans- Isomerisierung von freien Tetrapyrrolchromophoren</u>	18
1.1 <u>Photoreaktionen an synthetischen, helicalen Modellbilinen</u>	22
1.1.1 Darstellung der Ausgangsprodukte Oktaethylbiliverdin und Dihydrooktaethylbiliverdin	22
1.1.2 Darstellung von Konfigurationsisomeren	23
1.1.2.1 Anlagerung des Nucleophils und Photoumwandlung (Oktaethylbiliverdin)	25
1.1.2.2 Eliminierung des Nucleophils und Aufreinigung der Isomere (Oktaethylbiliverdin)	27
1.1.2.3 Abweichungen von den standardisierten Reaktionsbedingungen (Oktaethylbiliverdin)	29
1.1.2.4 Reaktionsablauf bei der Isomerisierung von Dihydrooktaethylbiliverdin	30
1.1.3 Eigenschaften der Konfigurationsisomere	32
1.1.3.1 Spektrale Unterschiede	32
1.1.3.2 Abhängigkeit der E/Z- Photoreversion vom Lösungsmittel	40
1.1.3.3 Säure-/Basen- katalysierte E/Z- (Photo-) Reversion	45
1.1.3.4 Abhängigkeit der E/Z- Reversion von der Temperatur	47
1.1.3.5 Photoreaktionen von Dihydrooktaethylbiliverdin und Oktaethylbiliverdin in Ab-	50

	hängigkeit von Lösungsmittel, Lichtqualität und anderer Faktoren	
1.1.3.6	Reaktion von Dihydrooktaethylbiliverdin mit Salzsäure	58
1.1.4	Fluoreszenzmessungen an Modellchromophoren	59
1.1.5	¹ H- Kernresonanzspektroskopie an Konfigurationsisomeren	60
1.2	<u>Photoreaktionen an cyclisch helicalen und gestreckten Biliverdinen</u>	67
1.2.1	Biliverdin IX α und sein Dimethylester	68
1.2.1.1	Darstellung der Ausgangsprodukte	68
1.2.1.2	Konformations- und Konfigurationsisomere bei Biliverdin IX α - Dimethylester	70
1.2.1.3	Versuch der Z/E- Isomerisierung bei der freien Säure	72
1.2.1.4	Z/E- Isomerisierung im Dimethylester	74
1.2.2	Biliverdin IX β ; τ - und δ - Dimethylester und daraus hervorgehende gestreckte Verbindungen	76
1.2.2.1	Versuch der Z/E- Isomerisierung beim Biliverdin IX τ - Dimethylester	79
1.2.2.2	Cyclisierungsreaktionen bei Biliverdin IX τ - und δ - Dimethylestern	80
1.2.2.3	Versuch der Z/E- Isomerisierung beim Phorcabilin- Dimethylester	83
1.2.2.4	Versuch der Z/E- Isomerisierung beim Isophorcabilin- Dimethylester	89
1.3	<u>Fourier Transform- Infrarot Spektroskopie</u>	90
1.3.1	ZZE/ZZZ- Oktaethylbiliverdin/Dihydrooktaethylbiliverdin als Modells-substanzen	91
1.3.2	Infrarot- Differenz beim Phytochromsystem (Pr/P _{fr})	105
1.3.3	Schwingungsspektroskopie bei Phycocyanin	109
1.4	<u>Existenz eines Zwischenproduktes bei der ZZE/ZZZ- Photoreversion</u>	109
2.	<u>Cis/Trans- Isomerisierung proteingebundener Tetrapyrrolchromophore</u>	111

2.1	<u>Konfigurationsisomere bei Phycocyanin-Peptiden</u>	112
2.2	<u>Konfigurationsisomere bei harnstoff- denaturiertem Phycocyanin sowie seiner α- und β-Untereinheit</u>	117
2.2.1	Ermittlung der Reaktionsbedingungen	119
2.2.2	Bestimmung des ZZE- Isomerenanteils in denaturiertem Phycocyanin nach Abtrennung von Mercaptoethanol	123
2.2.2.1	Abhängigkeit vom pH-Wert	123
2.2.2.2	Stabilität der Isomere	129
2.2.3	Bestimmung des ZZE- Isomerenanteils in nativem Phycocyanin nach Renaturierung	130
2.2.3.1	Abhängigkeit vom pH- Wert	132
2.2.3.2	Stabilität der Isomere	138
2.2.4	Darstellung von ZZE- Isomeren bei der α -Untereinheit	140
2.2.4.1	Reaktion mit Mercaptoethanol	141
2.2.4.2	Bestimmung des ZZE- Isomerenanteils	141
2.2.5	Darstellung von ZZE- Isomeren bei der β -Untereinheit	143
2.2.5.1	Addition von Mercaptoethanol	145
2.2.5.2	Bestimmung des ZZE- Isomerenanteils	145
2.2.6	CD- Daten aus der ZZE/ZZZ- Isomerisierung von Phycocyanin	146
2.3	<u>Z/E- Isomerisierung der α- und β- Untereinheit im harnstoff- freien Milieu</u>	149
2.3.1	Addition von Mercaptoethanol an native Biliproteine	149
2.3.2	Photoreaktionen der β - Untereinheit in partiell "reduziertem" Zustand	151
2.3.2.1	Z/E- Isomerisierung	153
2.3.2.2	E/Z- Isomerisierung	156
2.3.3	Abhängigkeit der Z/E- Isomerisierung von der eingestrahlten Wellenlänge	161
2.3.4	Abhängigkeit der Z/E- Isomerisierung vom Grad der Mercaptoethanolanlagerung	162
2.3.5	Reversibilität der Orangelicht- Reaktion	164
2.3.6	Isomerisierung bei partiell "reduziertem" Phycocyanin nur an bestimmtem Chromophor?	165
2.3.7	Vergleich der E/Z- Isomerisationsraten von partiell harnstoff- denaturiertem zu	166



	partiell mit Mercaptoethanol- behandeltem Phycocyanin	
2.3.8	CD - Messungen an partiell mit Mercaptoethanol umgesetzter / isomerisierter β -Untereinheit	168
2.3.8.1	Hinreaktion (Z/E- Isomerisierung)	168
2.3.8.2	Rückreaktion (E/Z- Isomerisierung)	171
2.4	<u>Photoisomerisierung von nativem Phycocyanin</u>	174
2.4.1	Vorkommen von ZZE- konfigurierten Phycocyanin- Chromophoren "in situ"	174
2.4.2	Vorkommen von ZZE- konfigurierten Phycocyanin- Chromophoren "in vitro"	175
2.4.2.1	Photoisomere in lyophilisiertem Phycocyanin	176
2.4.2.1.1	Photoumwandlung bei Phycocyanin, gelöst und gemessen in Harnstoffpuffer	177
2.4.2.1.2	Stabilität von ZZE- Isomeren in saurem Harnstoffpuffer	179
2.4.2.1.3	Photoumwandlung bei Phycocyanin, gelöst und gemessen in Phosphatpuffer	181
2.4.2.1.4	Stabilität von ZZE- Isomeren in neutralem Phosphatpuffer	182
2.4.2.1.5	Photoumwandlung bei enzymatisch abgebautem Phycocyanin	183
2.4.2.1.6	Einfluß von Licht auf lyophilisiertes Phycocyanin	183
2.4.2.1.7	Auswirkung von Licht während der Lyophilisation	185
2.4.2.2	Photoisomere in Phycocyanin- Lösungen	189
2.4.2.3	Versuch zur Identifizierung von Photoisomeren in kristallinem Phycocyanin	189
2.4.2.4	Photoisomere in lyophilisierten Untereinheiten	190
2.4.2.5	Konfigurationsänderungen durch Tenside	192
2.5	<u>Vergleich der Z/E- Photoisomerisationen von Phycocyanin zu Phytochrom und Phycocochrom</u>	194
C.	ZUSAMMENFASSUNG	198

D. EXPERIMENTELLER TEIL	204
1. <u>Material, Geräte und Methoden</u>	204
1.1 Reagenzien	204
1.2 Algenmaterial	204
1.3 Chromatographie	205
1.4 Spektroskopie	205
1.5 Belichtungseinrichtungen	207
1.6 Gefriertrocknung	208
1.7 Schutzmaßnahmen	208
2. <u>Präparationsvorschriften</u>	209
2.1 Darstellung der Ausgangsverbindungen	209
2.1.1 ZZZ- Oktaethylbiliverdin	209
2.1.2 ZZZ- A- Dihydrooktaethylbiliverdin	209
2.1.3 ZZZ- Biliverdin IX α	210
2.1.4 ZZZ- Biliverdin IX α - Dimethylester	211
2.1.5 ZZZ- Biliverdin IX α , β , γ , δ - Dimethylester	212
2.1.6 Phorcabilin- Dimethylester	214
2.1.7 Isophorcabilin- Dimethylester	214
2.1.8 Sarpedobilin- Dimethylester	215
2.1.9.1 Phycocyanin aus <u>Mastigocladus laminosus</u>	215
2.1.9.2 Untereinheiten aus Phycocyanin	215
2.1.9.3 Chromopeptide aus Phycocyanin	216
2.2 Darstellung von Z/E- Isomeren	217
2.2.1 4Z,10Z,15E- Oktaethylbiliverdin	217
2.2.2 4Z,10Z,15E- Dihydrooktaethylbiliverdin	218
2.2.3 Phycocyanin mit 4Z,10Z,15E- konfigurierten Chromophoren	218
E. LITERATURVERZEICHNIS	219

Im Text verwendete Abkürzungen:

BR / Bilirubin
BV / Biliverdin
BV-dme / Biliverdindimethylester
DHOEBV / Dihydrooktaethylbiliverdin
OEBV / Oktaethylbiliverdin
Pr / Hellrot absorbierende Form von Phytochrom
Pr_r / Dunkelrot absorbierende Form von Phytochrom
P_{b1} / gebleichte Form von 39kD Phytochrom
PC / Phycocyanin
UE / Untereinheit
ZZZ / 4Z, 10Z, 15Z- konfiguriertes Verdin
ZZE / 4Z, 10Z, 15E- konfiguriertes Verdin
Z-Z / 4Z, 15Z- konfiguriertes Rubin
Z-E / 4Z, 15E- konfiguriertes Rubin

DDQ / Dichloro- dicyano- benzochinon
DMF / Dimethylformamid
DMSO / Dimethylsulfoxid
Hac / Eisessig
HMPT / Hexamethylphosphorsäuretriamid
KPP / Kaliumphosphatpuffer
LM / Lösungsmittel
MeOH / Methanol
SDS / Natrium- dodecylsulfat
Tfa / Trifluoressigsäure
THF / Tetrahydrofuran

DC / Dünnschichtchromatographie
DEAE / Diethylaminoethyl-
KG / Kieselgel
NP / Normal- (=KG) Platte
RP / Reverse- Phase Platte

CARS / Coherent Anti-Stokes Raman Spektroskopie
E / Absorption
FT-IR / Fourier- Transform Infrarot- Spektroskopie
hv / Licht, Belichtung
RT / Raumtemperatur
Wz / Wellenzahlen

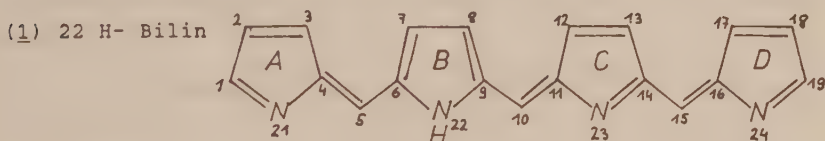
A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1. Vorkommen und Bedeutung offenkettiger Tetrapyrrole

Lineare offenkettige Tetrapyrrolsysteme, sogenannte Gallenfarbstoffe, spielen eine wichtige Rolle bei biochemischen, physiologischen und regulatorischen Abläufen in der Tier- und Pflanzenwelt.

Allen Pigmenten gemeinsam ist ein Skelett aus vier Pyrrolringen, verbunden durch drei C₁-Brücken. Vorstufen dieser Tetrapyrrole bilden Eisen- Porphyrine, deren Ringsystem durch Oxidation aufgebrochen wird. Dabei geht das Zentralatom, sowie an der Spaltungsstelle, das jeweilige Ring C-Atom verloren; zugleich werden an den Endpositionen Carbonylfunktionen ausgebildet. (Zur Biogenese und Nomenklatur siehe SCHMID und McDONAGH, 1979; McDONAGH, 1979; BONNETT, 1979).

Die derzeit gebräuchliche Bezeichnung der Gallenfarbstoffchromophore basiert auf dem 22 H- Bilin- System (1) nach JUPAC-JUB (1980), jedoch werden parallel dazu auch noch die jeweiligen Trivialnamen verwendet.



Das wohl bekannteste Beispiel bei Vertebraten stellt Biliverdin IX α (11a), ein Abbauprodukt des Hämoglobins, dar. Seine Transportform im Blut bildet Bilirubin IX α (2), entstehend durch enzymatische Reduktion des Verdins an C-10, als Serumalbuminkomplex oder Kohlehydratkonjugat (siehe A. 2.1). Bei niederen Tieren, z.B. Schmetterlingen, dienen Gallenfarbstoffe vermutlich hauptsächlich der Schutzfärbung von Larve und Imago (Übersicht bei RÜDIGER, 1970 und 1971; KAYSER, 1985). Dazu zählen Biliverdin IX γ (14) sowie linear gestreckte Tetrapyrrolsysteme wie Phorcabilin (16) und Iso-phorcabilin (18), BOIS-CHOUSSY und BARBIER (1978), siehe B. 1.2.2).

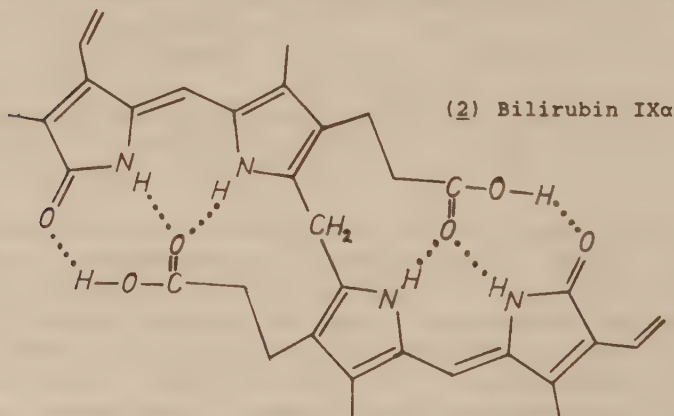
Am weitesten verbreitet findet man offenkettige Tetrapyrrole, gebunden an Proteine, im Pflanzenreich. Diese Biliproteide besitzen z.B. photomorphogenetische Funktionen als sensorische Reaktionszentrumspigmente bei höheren Pflanzen

(Phytochrom, siehe A. 2.2) und Cyanobakterien (Phycochrome, siehe A. 2.4), sowie als Antennenpigmente in verschiedenen Algen (Phycocyanin, Allophycocyanin, Phycoerythrin, etc.; Übersicht bei SCHEER, 1982; siehe A. 2.3 und B. 2).

2. Photochemische Reaktionen und ihre physiologischen Auswirkungen

2.1 Bilirubin IX α

Bilirubin IX α (2) kommt als Abbauprodukt des Hämoglobins in Blut und Gewebeflüssigkeiten vor. Durch Konjugation mit Kohlehydraten (Glucose, Xylose) oder Serumalbumin wird es wasserlöslich und kann über die Gallenflüssigkeit ausgeschieden werden. Überschüssiges, nicht konjugiertes BR ist wasserunlöslich, bei Verbleib im Körper toxisch und verantwortlich für die dunkle Hautfärbung bei Gelbsucht (STOLL et al., 1979). Zur Standardtechnik für die Senkung der BR-Konzentrationen bei gelbsüchtigen Neugeborenen hat sich in den letzten Jahren die Phototherapie entwickelt (STOLL et al., 1979; LIGHTNER et al., 1979).



Erste Annahmen, es handle sich bei den durch Belichtung erzeugten Ausscheidungsprodukten um Oxidationsprodukte des Bilirubins mit Singulett-Sauerstoff (Referenzen siehe STOLL, et al. 1979), bewahrheiteten sich nicht. Dafür haben in vitro Versuche ergeben, daß bei Bestrahlung mit Blaulicht von BR IX α in polarem, anaerobem Milieu zwei unterschiedliche Typen von Photoprodukten gebildet werden (STOLL et al., 1979). Zum Ersten handelt es sich dabei um die Photoisomerisations-

produkte 4E,-,15Z, 4Z,-,15E, und (in sehr kleinen Mengen) 4E,-,15E (McDONAGH et al., 1979a; FALK et al., 1982) des natürlich vorkommenden 4Z,-,15Z- konfigurierten (BONNETT et al., 1978) Bilirubins IX α . Diese Konfigurationsisomere sind äußerst labil und schwierig nachzuweisen, da sie sofort (bei Chromatographie an Kieselgel; in unpolaren Lösungsmitteln; bei Bestrahlung mit Licht >500nm; bei höheren pH- Werten $\approx$ 8), oder etwas langsamer (Dunkelreaktion bei Raumtemperatur) zum Ausgangsprodukt revertieren (McDONAGH et al. 1979a; STOLL et al., 1979).

Daneben wurde eine zweite Klasse von Photoprodukten gefunden (STOLL et al., 1979), bei denen es sich um intramolekulare Zyclisierungsprodukte der Vinylgruppe an C-3 mit C-7 handelt (Verbrückung von Ring A und B durch einen zusätzlichen Siebenring und dadurch auch veränderte Konfiguration; BONNETT et al., 1984; YOKOYAMA et al., 1984). Diese Produkte - Lumirubin (4E,-,15Z) und Iso- Lumirubin (4E,-,15E) - sind stabiler als die nicht fixierten Photoisomere; sie bilden auch bei Weiterbehandlung kein ursprüngliches BR IX α zurück (STOLL et al., 1979).

Sämtliche auf diese Art präparierten Photoprodukte erwiesen sich als polarer und leichter wasserlöslich als Bilirubin, und konnten deshalb nach Belichtung erkrankter Neugeborener im Urin nachgewiesen werden.

2.2 Phytochrom

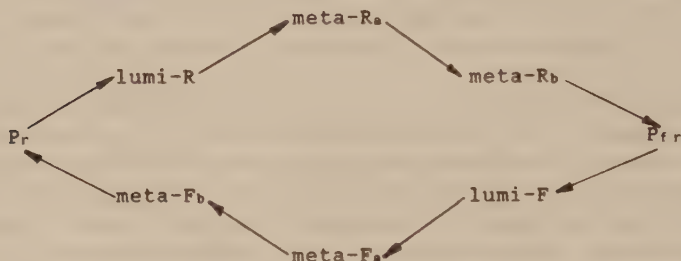
Das sensorische Pigment Phytochrom dient höheren Pflanzen als physiologische Uhr (Tag/Nacht), sowie für die Bestimmung der Dauer (Sommer/Winter), Intensität (Licht/Schatten), Qualität (Weiß-/Rot-/Grünlicht) und auch Polarisierung und Richtung der Lichteinstrahlung.

Phytochrom als Lichtrezeptor für Photomorphogenesen stellt ein photoreversibles System dar. Es existiert in zwei Formen, deren Verhältnis von der Lichtqualität abhängig ist. In der Pflanze wird im Laufe der Biosynthese Phytochrom in seiner physiologisch inaktiven Form, Pr, bereitgestellt, aus dem im Licht die physiologisch aktive Form, P_{fr}, gebildet wird. Pr absorbiert bei 660nm und wird als Hellrot- Form bezeichnet; sie kann durch Hellrot- Bestrahlung in P_{fr}, welches bei 730nm absorbiert, umgewandelt werden. P_{fr} kann durch Dunkelrotbestrahlung oder in einer Dunkelreaktion (Lebensdauer ca. 45min; MOHR, 1981) Pr zurückbilden.

Der Photozyclus des Phytochroms kann in eine Reihe von ein-

zelnen Schritten gegliedert werden (Übersicht bei RÜDIGER und SCHEER, 1983). Dabei unterscheiden KENDRICK und SPRUIT (1977) Photoreaktionen und Dunkelrelaxationen.

Schema 1: Modell eines möglichen Phytochromzyclus von KENDRICK und deKOK (1983):



Zu den Photoreaktionen im Kreislauf (Schema 1) zählen die Bildung von lumi-R und lumi-F aus Pr bzw. Pfr (KENDRICK und deKOK, 1983). Diese Photoreaktionen, sowie die Relaxationen zu meta-Ra und meta-Fa bleiben, mit nur geringen Änderungen des Proteinanteils, auf den Chromophor beschränkt. Bei den übrigen Teilreaktionen (Bildung von meta-Rb, Pfr, meta-Fb, und Pr) vermutet man eine konformative Wechselbeziehung zwischen dem Chromophor und dem Apoprotein (KENDRICK und SPRUIT, 1977; KENDRICK und deKOK, 1983).

Der Chromophor des Phytochroms (3a) zählt zu den an Ring A gesättigten 2,3- Dihydrobiliverdinen und ist an C-3 über eine Thioetherbindung kovalent an das Apoprotein (124kD) gebunden (Übersicht bei RÜDIGER und SCHEER, 1983). Für die Photoreaktion des Chromophors wird neben früher vorgeschlagenen Tautomerisierungsreaktionen (SARKAR und SONG, 1981) und Photooxidationen/ -reduktionen (Übersicht bei SCHEER, 1982 und 1984) jetzt vor allem eine Z/E- Isomerisierung an der Methinbrücke zwischen Ring C und D diskutiert (THÜMLER et al., 1981; THÜMLER und RÜDIGER, 1983; THÜMLER, 1984).

Das vom Licht abhängige Gleichgewicht der beiden Phytochromformen Pr und Pfr zueinander führt bei Vorliegen der physiologisch aktiven Form zu Änderungen der Gen- Expression (MOHR 1981). Dadurch wird bei der Pflanze Keimung, Wurzelbildung, Entwicklung des Keimlings (etioliertes Längenwachstum bei Lichtmangel), Blüte, Blattfall bei Laubböhlzern, Brechen der Winterruhe der im Herbst angelegten Knospen etc. eingeleitet.

Vor allem für die Keimung der Samen gewinnen auch die Intermediate im Phytochromzyklus an Bedeutung. Diese reagieren nur dann sensibel auf Belichtung, wenn sie vorher einen Quellungsprozess durchlaufen haben. Die Bildung von P_{fr} ausgehend von P_r ist nämlich in trockenem Zustand bei der Stufe $meta-R_a$ / $meta-R_b$ unterbrochen (KENDRICK und deKOK, 1983).

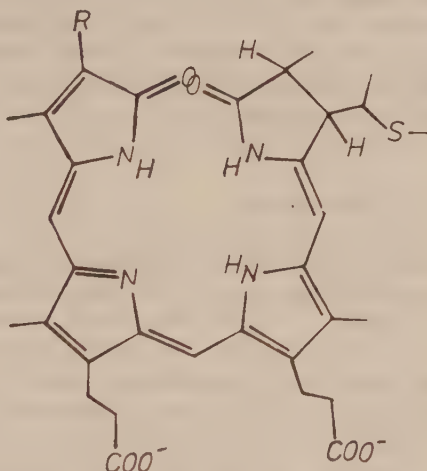
(3a) Phytochrom

R: $-CH=CH_2$

(3b) Phycocyanin

R: $-CH_2-CH_3$

(Chromophorgeometrie:
all-syn- Z (bei denaturiertem Protein))



2.3 Phycocyanin

Phycocyanin stellt neben Allophycocyanin, Phycoerythrin und Phycoerythrocyanin ein wichtiges Lichtsammelpigment bei Cyanobakterien, Rotalgen und Kryptophyceen dar (Übersicht bei SCHEER, 1982). Die Biliproteide sind in Cyanobakterien und Rotalgen lokalisiert in Phycobilisomen, die auf der Außenseite der Thylakoidmembranen aufsitzen. Der Aufbau der Phycobilisomen entspricht der Aufgabe der Biliproteide, die Lücke im Wirkungsspektrum der Chlorophylle auszufüllen. Der Energietransfer verläuft durch überlappende Absorptions-/Fluoreszenzwellenlängen von Phycoerythrin/Phycoerythrocyanin an der Peripherie des Phycobilisoms, über Phycocyanin zum Kern, der aus dem am langwelligsten absorbierenden Allophycocyanin gebildet wird. Von da wird die Energie, möglicherweise unterstützt durch gefärbte Linkerpeptide, zu Chlorophyll a im Reaktionszentrum innerhalb der Membran weitergeleitet (Referenzen bei SCHEER, 1982; MacCOLL und GUARD-FRIAR 1987).

Der molekulare Aufbau von Phycocyanin besteht aus zwei Untereinheiten, von denen die leichtere α -UE einen, die

schwerere β - UE zwei Chromophore trägt. Diese Chromophore ähneln dem des Phytochroms (3b, einziger Unterschied die Ethyl- statt der Vinylgruppe an C-18), und sind ebenfalls an C-3 mittels einer Thioetherbindung (KÖST, 1975) kovalent an die Aminosäure Cystein des Apoproteins (in Mastigocladus laminosus: α_{64} , β_{64} , β_{155}) gebunden (FRANK et al., 1978). In neutralen Lösungen (z.B. niedrig molarem KPP) liegt Phycocyanin als Trimeres vor (FISCHER et al., 1988). Zwei Trimere (in der Form eines flachen Doppelscheibchens; MÖRSCHER et al., 1977) bilden den Aggregationszustand des PC's im Phycobilisom (Hexamer).

2.4 Phycochrom

Neben einem Rot/Dunkelrot- Antagonismus in Rotalgen (ähnlich der Hellrot/Dunkelrot- Reversion des Phytochroms bei höheren Pflanzen), einer Blau/Gelb- Reaktion in Grünalgen und einer UV/Blau- Reaktion in Pilzen, kennt man auch in Cyanobakterien einen entsprechenden Grün/Rot- Antagonismus (Übersicht bei BJÖRN, 1979). Die verantwortlichen photoreversiblen photochromen Pigmente werden als Phycochrome bezeichnet. Sie sind z.B. verantwortlich für die chromatische Adaptation, vor allem der Bildung von Phycoerythrin. Diese kann in vivo durch Grünlicht stimuliert und mit Rotlicht unterdrückt werden (BRYANT, 1982). Umgekehrt wird durch Rotlicht die Ausbildung von Phycocyaninen gefördert (BRYANT, 1981). In der Natur wird dadurch die jeweilige Zusammensetzung der Pigmente in den Phycobilisomen der Lichtqualität am Standort der Alge, angepaßt (BRYANT und COHEN-BAZIRE, 1981a).

Bisher konnten vier verschiedene photoreversibel photochrome Pigmente (Phycochrom a bis d) isoliert werden (BJÖRN und BJÖRN, 1976; BJÖRN, 1978). Davon lassen sich zwei unmittelbar durch Rot/Grün- Belichtung reversibel ineinander überführen. Das zweite Paar steht neben dieser Lichtreaktion durch eine zusätzliche Dunkelreaktion mit einem dritten Pigment in Verbindung. Ihre Identität mit den Photorezeptoren ist aber derzeit noch umstritten (SCHEER, 1982; KUFER, 1988).

Die Phycochrome verfügen über einen oder mehrere, vermutlich dem Phytochrom und Phycocyanin ähnlichen, Tetrapyrrolchromophore. Entsprechend der spektroskopischen Daten liegt dabei der Chromophor in seiner grünabsorbierenden Form in einer gestreckteren Konfiguration (also vermutlich E- isomer) vor, als in der rotabsorbierenden Form (BJÖRN, 1979).

3. Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte versucht werden, von unterschiedlichen Gallenfarbstoffen Konfigurationsisomere darzustellen, ihr biochemisches und spektroskopisches Verhalten zu untersuchen, und mit den entsprechenden bestehenden Daten zur Änderung des Phytochromchromophors und der Phycochrome während der Photoreversion zu vergleichen.

Dafür wurden synthetisch hergestellte Modellpigmente wie OEBV und DHOEBV, Pigmente der Biliverdin IX α -Reihe und daraus ableitbare gestreckt fixierte Chromophore wie Phorcalin und Isophorcalin eingesetzt.

Die Arbeiten wurden dann, zur Überleitung auf das Phytochromsystem, ausgedehnt auf die Chromophore des Phycocyanins in Peptiden, im integralen Protein und in seinen Untereinheiten.

Im Vordergrund stand dabei, ausgehend von der Rubinoid-Methode nach FALK et al. (1980), die Erarbeitung von Methoden für die Darstellung von OEBV/DHOEBV-Isomeren in präparativem Maßstab, um ausreichende Mengen für FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ und UV-Vis spektroskopische Untersuchungen bereitzustellen.

Durch Modifizierung der Methoden wurde versucht, im analytischen Maßstab eine Z/E-Isomerisierung auch direkt an cyclischen Biliverdinen (freie Säure und Dimethylester) durchzuführen, sowie bei den gestreckt fixierten Chromophortypen eine Isomerisierung an den noch zugänglichen Methinbrücken zu erzielen.

Auf der Grundlage der Z/E-Isomerisierung bei Phytochrom (THÖMMLER und RÖDIGER, 1983) und PC-Peptiden, wurde die Methode modifiziert und auf integrales, trimeres Phycocyanin sowie dessen Untereinheiten aus dem Cyanobakterium Mastigocladus laminosus angewendet.

Parallel dazu wurde untersucht, ob und inwieweit denaturierende Einflüsse auf das Protein Auswirkungen auf eventuelle Photoreaktionen des Phycocyanins haben könnten. Dies ist vor allem für die Frage nach dem Vorhandensein von photoreversiblen Chromophoren bei PC "in vivo" interessant.

Ein weiteres Kapitel befaßte sich mit schwingungsspektroskopischen Untersuchungen an Z/E- isomeren Gallenfarbstoffen. Durch die Entwicklung der Fourier- Transform Infrarot- Spektroskopie wurden kürzlich sehr detaillierte Informationen zu den Primärreaktionen an Retinal- Proteinen erhalten. Durch parallele Untersuchungen von Modellen und Phytochrom sollte diese Methode auch auf Biliproteide anwendbar werden.

Die Charakterisierung der spektralen Veränderung bei der E/Z- Isomerisation von Modellchromophoren in Lösung sollte zudem Rückschlüsse auf die Veränderung der Chromophore im Pr/Pfr- Zyklus geben.

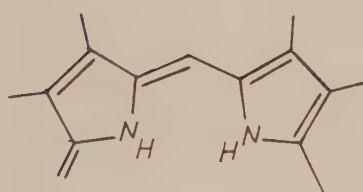
B. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Cis/Trans- Isomerisierung von freien Tetrapyrrolchromophoren

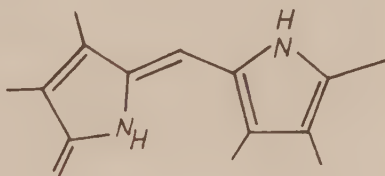
Die Geometrie der Tetrapyrrolchromophore wird allgemein bestimmt durch Konformation und Konfiguration (Schema 2). Konformationsänderungen werden durch Drehung um eine -C-C- Einfachbindung hervorgerufen (syn- Z, anti- Z), während Konfigurationsänderungen (syn- Z zu syn- E) nur durch Auflösung, Isomerisation und Neubildung der -C=C- Doppelbindung (d.h. des π -Elektronensystems) zustande kommen. Die Isomerisationsenergie kann auf thermischem oder photochemischem Weg durchgeführt werden.

Die folgende Arbeit an freien und proteingebundenen Bilatrienen und 2,3- Dihydrobilatrienen- a,b,c befaßt sich mit der Änderungen der Konfiguration, hervorgerufen durch Belichtung.

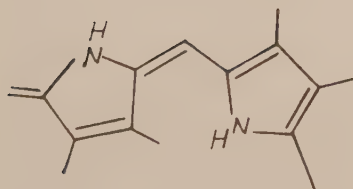
Schema 2: Konformations- und Konfigurationsisomere am Beispiel einer dipyrrolischen Partialstruktur



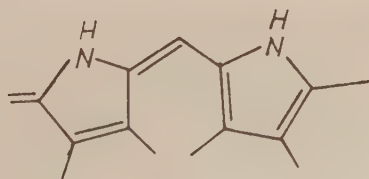
syn- Z



anti- Z



anti- E



syn- E

Chromophore vom Bilatrien- Typ besitzen drei Methinbrücken, wodurch theoretisch (siehe Schema 2) acht Konfigurationsisomere denkbar wären: 5Z,10Z,15Z, ZZE, ZEE, ZEZ, EZZ, EEZ, EZE und EEE. Diese sollten theoretisch auch durch Isomerisierung der entsprechenden Doppelbindungen an C-4, 10 und 15 ineinander umgewandelt werden können.

Freie Verdine nehmen in vitro bevorzugt die all- syn Konformation mit all- Z Konfiguration ein. Die ZZZ- Form stellt das stabilste Isomer dar, E- konfigurierte Isomere sind höherenergetisch und durch unterschiedlich hohe Energiebarrieren von ihnen getrennt (FALK und MÖLLER, 1983d). Durch Belichtung können in Lösung z.B. ZEZ- Isomere (BV IX α - dme, BRASLAVSKY et al., 1983) erhalten werden, die jedoch sehr kurzlebig sind und dann erneut zu ZZZ revertieren (siehe B. 1.2.1.2). E- Isomere an C-4 oder C-15 konnten bisher, aus "gewöhnlichen" Biliverdinen, auf direktem Weg nicht dargestellt werden.

Wird hingegen ein Biladien- a,c, wie z.B. das durch Reduktion an der Methinbrücke b erhaltene Bilirubin- IX α (2), unter anaeroben Bedingungen in CHCl₃ belichtet, stellt sich ein neues photostationäres Gleichgewicht ein, welches neben dem natürlich vorkommenden, 4Z,-,15Z- ("-" : Doppelbindung reduziert) konfigurierten BR- Isomer, Photobilirubine entstehen läßt (McDONAGH et al., 1979a; STOLL et al., 1979; FALK et al., 1982). Darunter fallen die 4E,-,15Z, Z,-,E und zu einem sehr geringen Anteil vorkommende E,-,E- Isomere (siehe A. 2.1). Da sie, infolge ihrer "aufgefalteten" Struktur polarer als die Edukte geworden sind, können sie von den kompakten, lipophilen, durch sechs Wasserstoffbrücken intramolekular verbundenen, 4Z,-,10Z- konfigurierten Isomeren leicht abgetrennt werden. Diese Photoisomere verhalten sich labil gegenüber Licht, Hitze, H⁺ bzw. OH⁻, womit sie erneut in den stabilsten Zustand (d.h. 4Z,-,15Z- Bilirubin IX α) rückführbar sind. Im Dunklen bleiben sie bei RT unter anaeroben Bedingungen ein bis zwei Tage stabil (FALK et al. 1982).

Die Darstellung von cis/trans- (Z/E-) konfigurierten Bilatrienen- a,b,c wurde zum ersten Mal von FALK et al. (1980) an Etiobiliverdin- IX τ (4) demonstriert. Dieser Chromophor verfügt über ein voll durchkonjugiertes π - Elektronensystem, d.h. die Elektronen liegen über beide Pyrromethenonhälften "verschmiert". Der intramolekular mögliche Protonenaustausch zwischen den Stickstoffatomen von Ring B und C bewirkt hauptsächlich eine strahlungslose Desaktivierung, weshalb es

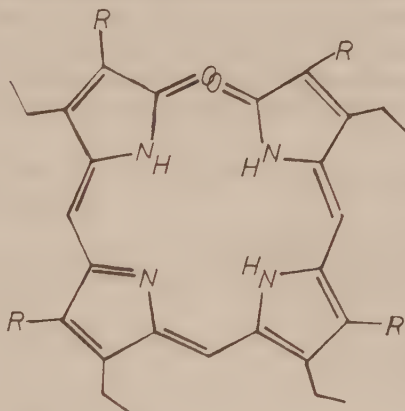
unmöglich ist, cis/trans- Isomere in Lösung (wie z.B. bei Dipyrrolen) durch direkte Photoisomerisation darzustellen. Pyrromethenone und ihre Arylanaloga bilden dagegen klassische geometrische Z/E- Isomere, die sich photochemisch ineinander umwandeln lassen (FALK et al., 1976). Sie werden durch die exocyclische Doppelbindung, die nicht durch tautomere Prozesse verschoben werden kann, stabilisiert.

(4) Etiobiliverdin- IXr

(R: -CH₃)

(5) Oktaethylbiliverdin

(R: -CH₂-CH₃)



Photokonversion an Verdinen kann dagegen nicht direkt durch Belichtung erzielt werden, sondern wird nur unter "Verzerrung" des Chromophorsystems z.B. durch N- Alkylierung oder Unterbrechung des Konjugationssystems an der mittleren Methinbrücke erreicht, wobei formal aus zwei Pyrromethenonen bestehende Rubine bzw. Rubinoide entstehen (FALK et al., 1980).

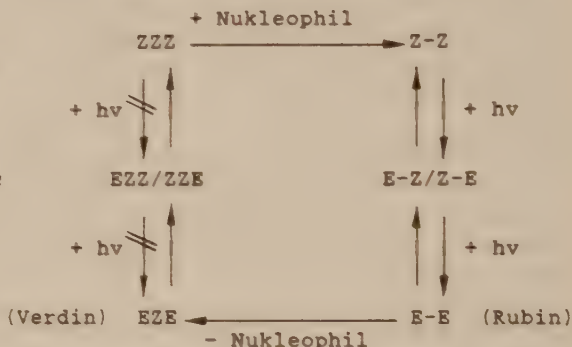
Einen Hinweis auf den Rubinoid- Weg lieferte die Beobachtung, daß sich Kieselgel oder Aluminiumoxyd bei der Chromatographie von Bilatrienen gelb färbte. Durch Belichtung derartig adsorbierter Chromophore konnte eine partielle Photo-reaktion, die einer Z/E- Isomerisierung entsprach, erzielt werden (FALK und GRUBMAYR, 1977).

Eine systematische Untersuchung von Nukleophilen ergab, daß basische primäre und sekundäre, sterisch nicht gehinderte, Amine, Thiole und CH- acide Verbindungen selektiv und reversibel an C-10 addieren. Bei KG/Al₂O₃ wirken also vermutlich die freien Hydroxylgruppen des Adsorbens als Donoren für die Anlagerung an die Methinbrücke. Als nicht reaktiv erwiesen sich sterisch gehinderte, schwach basische, Amine, Amide, Alkohole und Wasser (FALK et al., 1980).

Die Additionsreaktionen werden zusätzlich durch die Lösungsmittel, in denen sie ablaufen, beeinflusst. Sie zeigen eine stark ausgeprägte reversible Thermochromie, d.h. je niedriger die Temperatur, um so rascher die Anlagerung. Die Reaktionsgeschwindigkeit für die Bildung des Rubinoids ergibt ein Zeitgesetz zweiter Ordnung. Für den genauen Ablauf der Anlagerung werden zwei Möglichkeiten diskutiert: Erstens unter Einbeziehung des Lösungsmittels, welches dem Donor ein Proton entzieht und dadurch die nukleophile Anlagerung ermöglicht; zweitens eine direkte Addition des neutralen Donors an die Methinbrücke unter Bildung eines Zwitterions mit anschließender De-/Reprotonierung (FALK et al., 1980).

Schema 3:

Wege der Photoisomerisierung bei Biladienen- a,c (Rubinen/Rubinoïden) und Bilatrienen- a,b,c (Verdinen) in Lösung



Durch die Belichtung der C-10 Additionsprodukte von Etiobiliverdin- IXr (4) im Absorptionsbereich des Rubinoids (ca. 400nm) konnten in Lösung die Photoisomerisationsprodukte 4E-, 15Z-, Z-E, E-E und Z-Z- Rubinoid, und nach Eliminierung des Nukleophils 4E, 10Z, 15Z-, ZZE-, EZE- und ZZZ- konfigurierte Verdinchromophore identifiziert und isoliert werden (FALK et al., 1980).

Die Belichtung von E- Isomeren der Verdine führt im allgemeinen (siehe B. 1.1.2) zurück zum stabilen ZZZ (Schema 3). Eine Konfigurationsänderung von Z nach E ist jedoch nur durch den Umweg über das Rubinoid möglich.

Der Reaktionsablauf von FALK et al. (1980) - Addition an C-10, Belichtung, Eliminierung - wurde in der Folge auf die Präparation von Z/E- Isomeren bei freien und proteingebundenen Tetrapyrrolchromophoren angewendet.

Als Nucleophil wurde hauptsächlich 2- Mercaptoethanol herangezogen, da es sich durch Ausschütteln mit schwachen Basen

leicht vom Chromophor abtrennen läßt. Als Lösungsmittel für freie Verdine erwies sich DMSO als besonders günstig, weil das Gleichgewicht der Addition im Gegensatz z.B. zu CHCl_3 oder DMF stark auf die Seite des Produkts verschoben liegt (FALK et al., 1980). Dieses polare, aprotische Solvens wirkt als Brecher von Wasserstoffbrückenbindungen, welche die Isomerisierung, wenn auch nicht verhindern, so doch einschränken (Stabilisierung der Z,-,Z Konfiguration des Rubinoids).

1.1 Photoreaktionen an synthetischen, helicalen Modellbilinen

1.1.1 Darstellung der Ausgangsprodukte Oktaethylbiliverdin und Dihydrooktaethylbiliverdin

Ausgehend von Oktaethylporphyrin kann in einer Serie von Reaktionsschritten in relativ guter Ausbeute symmetrisch substituiertes Oktaethylbiliverdin (OEBV, 5; chem. Bezeichnung nach JUPAC-JUB (1980): 21,24- Dihydro- 2,3,7,8,12,13,17,18-oktaethylbilin- 1,19- dion), und sein an Ring A hydriertes Analogon 2,3- Dihydrooktaethylbiliverdin, 6; chem. Bezeichnung nach JUPAC-JUB (1980): 2,3,21,24- Tetrahydro- 2,3,7,8,12,13,17,18- oktaethylbilin- 1,19- dion) hergestellt werden (SCHMID, 1983).

OEBV (5): Im ersten Schritt wird dreiwertiges Eisen in das Porphyrinskelett eingebaut (WHITLOCK et al., 1969). Die daraus entstehende Häminverbindung (Eisen-III oktaethylporphyrinchlorid) wird nach einer Modifikation der Vorschrift von CAVALEIRO und SMITH (1973) einer gekoppelten Oxidation mit Sauerstoff/Ascorbinsäure unterworfen. Dabei wird das Ringsystem an einer Methinbrücke hydroxiliert (meso- Hydroxihäm), durch Oxidation und CO- Abspaltung das Brücken- Kohlenstoffatom 20 gegen eine Sauerstofffunktion ausgetauscht (Verдохämochrom) und zuletzt unter Verlust des Zentralatoms zum OEBV hydrolysiert.

DHOEBV (6): Ausgehend vom Eisen-III oktaethylporphyrinchlorid wird nach WHITLOCK et al. (1969) durch Reduktion mit metallischem Natrium in siedendem Amylalkohol unter Ausschluß von Sauerstoff trans- Oktaethylchlorin, und daraus durch Behandlung mit methanolischer Zinkacetatlösung, Zinkoktaethylchlorin dargestellt. Mit Thalliumfluoracetat wird ein Zwischenprodukt (Zink- meso- trifluoracetoxychlorin; CAVALEIRO

und SMITH, 1973) gebildet und dieses anschließend, gebunden an Al_2O_3 , mittels Luftsauerstoff oxidiert. Dabei wird das Ringsystem unter Verlust des Zn- Zentralatoms zum DHOEBV aufgebrochen.

(6) DHOEBV

($R_1/4$: H,

$R_2/3/5/6/7/8/9/10$: C_2H_5)

(7)

(R_3 : H,

$R_1/2/5/6/7/8/10$: CH_3 ,

R_9 : C_2H_5 , R_4 : $\text{CH}_2-\text{COOCH}_3$)

(8)

($R_1/2$: H,

$R_3/4/5/6/7/8/10$: CH_3 ,

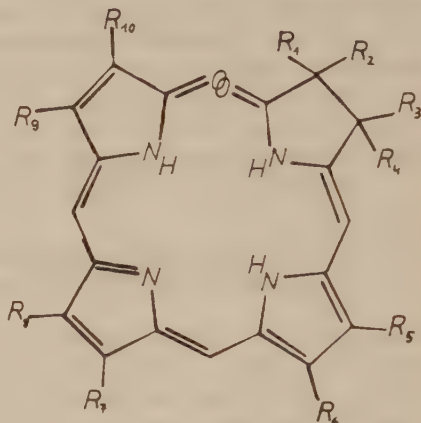
R_9 : C_2H_5)

(9)

($R_3/4$: H,

$R_1/2/5/6/7/8/10$: CH_3 ,

R_9 : C_2H_5)



1.1.2 Darstellung von Konfigurationsisomeren

OEBV (5) stellt ein symmetrisches, vollständig ungesättigtes Molekül mit acht identischen Substituenten an den β -ständigen C-Atomen dar. Bei der Darstellung von Konfigurationsisomeren sind theoretisch acht Varianten möglich. Berechnungen an Oktamethylbiliverdin (Substituenten wie Methyl-, Ethylgruppen oder Propionsäureketten ergeben nur eine unbedeutende Änderung des energetischen Gesamtzustandes des Moleküls) von FALK und MÜLLER (1983d) ergaben folgende Energieniveaus für die Isomere gegenüber dem stabilsten 4Z,10Z,15Z (nur ein Enantiomerentyp berücksichtigt):

ZZE - (21kJMol⁻¹), EZZ - (25~), ZEZ - (38~), EZE - (48~),
ZEE - (58~), EEZ - (63~), EEE - (90kJMol⁻¹)

Daneben werden die Konfigurationsisomeren durch hohe Energiebarrieren voneinander getrennt:

ZZE $\longrightarrow$ ZZZ (25kJMol⁻¹), EZZ $\longrightarrow$ ZZZ (51kJMol⁻¹),
weiter ansteigend in der vorherigen Reihenfolge.

Eine Entscheidung bezüglich der Konformation, offene (anti-) bzw. geschlossene (syn-) Geometrie (siehe Schema 2; z.B. Unterschied zwischen $E_{anti}Z_{syn}Z_{syn}$ zu $Z_{anti}Z_{syn}Z_{anti}$ bei Etiobiliverdin- IXr, 4) konnte auf experimentellem Weg (Nuclear Overhauser Effekt, Lanthaniden- induz. Verschiebung, FALK et al., 1984a) getroffen werden.

Für symmetrisch substituierte Chromophore wie das OEBV sind also sechs Isomere (4Z,10Z,15Z, EZZ=ZZE, ZEZ, EZE, EEZ=ZEE, EEE) möglich. Im Falle des Etiobiliverdins- IXr (4) konnten ZZZ, ZZE und EZE isoliert werden; diese liegen energetisch noch in einem stabilen Bereich mit niedrigen Bildungsenergien. Bei OEBV wurden bisher nie mehr als zwei Isomere, nämlich ZZZ und ZZE, gefunden. Falls ein EZE - Isomeres existiert, ist sein Anteil entweder sehr gering, oder seine energetische Lage derart ungünstig, daß es bei den gegebenen Reaktionsbedingungen nur sehr kurze Zeit stabil und daher nicht faßbar ist. Alle bisher erprobten Chromatographiemethoden zeigten nur das Vorhandensein von ZZZ und ZZE. Es wurde auch nie ein spektroskopischer Hinweis auf ein drittes Isomeres gefunden, welches theoretisch (vergleichbar zu 4; FALK et al., 1980) noch kürzerwelliger als das, gegenüber dem ZZZ- hypsochrom verschobene, ZZE- Isomer absorbieren müßte (Konjugationssystem an den Methinbrücken a und c gestört).

DHOEBV (6) verfügt über ein dem OEBV (5) analoges Substitutionsmuster. Sein Konjugationssystem ist durch Hydrierung an den Positionen C-2 und C-3 um eine Doppelbindung verkürzt. Im Rubinoidstadium liegen daher im Gegensatz zu OEBV zwei unterschiedliche Molekülhälften vor, ein Dipyrromethenon (Ring C-D) und ein Vinylpyrrol (Ring A-B), weshalb das 4E- und das 15E- Isomer unterschiedlich sind. Für diesen Chromophor wurde aber ebenfalls immer nur das 15E- neben dem ZZZ- Isomer bei der Photoumwandlung des Rubinoids erhalten (BLA-CHA-PULLER, 1979).

Berechnungen an E- konfigurierten 2,3- Dihydrobilatrienen- a,b,c von FALK et al. (1983a, b) ergaben, daß diese Chromophore thermodynamisch labiler sind, als die der entsprechenden ungesättigten Bilatriene- a,b,c (Aktivierungsenergie stark abgesenkt). Dies gilt sowohl für 15E-, aber im Besonderen für 4E- Isomere. Letztere konnten weder durch Photoreaktionen der Rubine, noch durch Kondensation von E- Dihydropyrromethenonen mit Pyrromethenonen (hierbei entstand im-

mer nur die ZZZ- Dihydroverbindung) erhalten werden. Belichtungsexperimente an Rubinoiden ergaben, daß selektive Belichtung sowohl im Bereich der Pyrromethanon- ($\approx 400\text{nm}$) als auch der Vinylpyrrolstruktur ($\approx 270\text{nm}$) stets zur Isomerisierung im Pyrromethanonfragment (d.h. an C-15) führte (FALK et al., 1983b). Dies deutet auf eine effiziente intramolekulare Energieübertragung hin. Weiterführende Untersuchungen ergaben, daß tatsächlich 4E- Isomere gebildet werden, diese aber unmittelbar rückisomerisieren (EZZ/ZZZ und EZE/ZZE; siehe Schema 3) und sich deshalb einem Nachweis entziehen. Die Konfigurationsänderung an C-4 bleibt ohne Auswirkung auf das Absorptionsspektrum (FALK et al., 1983b); hingegen unterscheidet sich das 15E- Isomere deutlich von ZZZ (hypsochrome Verschiebung, siehe B. 1.1.3.1).

Stabile 4E- Isomere können hingegen dann isoliert werden, wenn an C-3 ein "raumfüllender" Ligand (z.B. $-\text{CO}_2-\text{COOCH}_3$; 7) eingeführt wird (FALK et al., 1983a).

1.1.2.1 Anlagerung des Nucleophils und Photoumwandlung (Oktaethylbiliverdin)

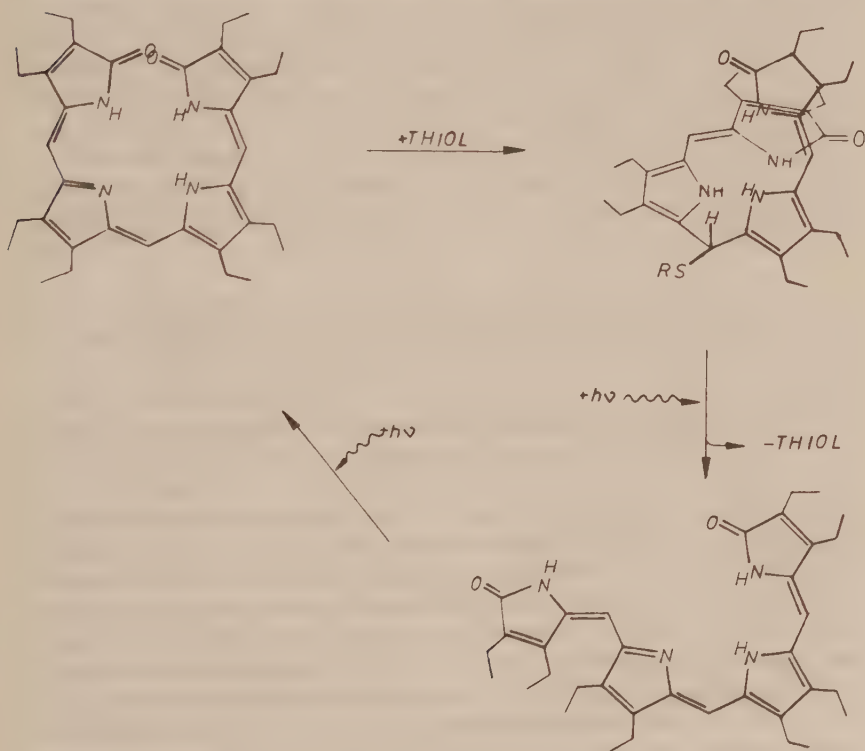
Die Photoisomerisierung von OEBV und DHOEBV folgte der Methode von FALK et al. (1980) und wurde auch von KUFER et al. (1982) bzw. THOMMLER und RÖDIGER (1983) in ähnlicher Form auf diese Chromophore angewendet.

Die Umsetzung des Verdins mit 2- Mercaptoethanol (Schema 4) wurde bei Grünlicht im Eisbad durchgeführt (siehe C. 2.2.1). Während der Reaktion wurde ein langsamer Strom von Argon (bzw. N_2) durch den Reaktionsansatz geleitet, der zur Durchmischung, hauptsächlich aber als Schutzgas diente. Das Additionsprodukt wird leicht durch Luftsauerstoff angegriffen (Photooxidationsprodukte durch Reaktion mit Singulett- Sauerstoff sind auch aus den Lichtreaktionen von BR IX α (2) bekannt, STOLL et al., 1979). Wegen der Schwerlöslichkeit des Pigments in DMSO wurde es zuerst in einigen Tropfen CHCl_3 bzw. CH_2Cl_2 angelöst, und erst dann in einer kleinen Menge DMSO aufgenommen.

Die Zugabe von Mercaptoethanol (Endkonzentration maximal 10 Vol. %) führte innerhalb von 15 bis 20 Minuten zur Bildung des Rubinoids (Farbänderung von Blaugrün zu intensivem Gelb). Die Umsetzung mit größeren Mercaptoethanolüberschüssen (≥ 20 Vol. %) ergab eine orangene Reaktionsmischung. Der Reaktionsablauf konnte damit erheblich beschleunigt werden

(sofortiger Farbumschlag nach Zugabe), hatte jedoch einen negativen Einfluß auf die Ausbeute an Verdin- Isomeren. Die Rubinoidlösung wurde, erneut unter Schutzgas, in einer Eis/Wassermischung zur Kühlung aus ca. 5cm Entfernung mit Weißlicht bestrahlt (siehe C. 1.5). Die Belichtungsdauer betrug maximal zwei Minuten pro mg eingesetztes Verdin. Längere Belichtungszeiten führten zu keiner Ausbeuteverbesserung des ZZE- Isomers. Dagegen wurde ein deutlicher Rückgang der Rubinoidabsorption beobachtet, der auf partielles Ausbleichen zurückgeführt wurde.

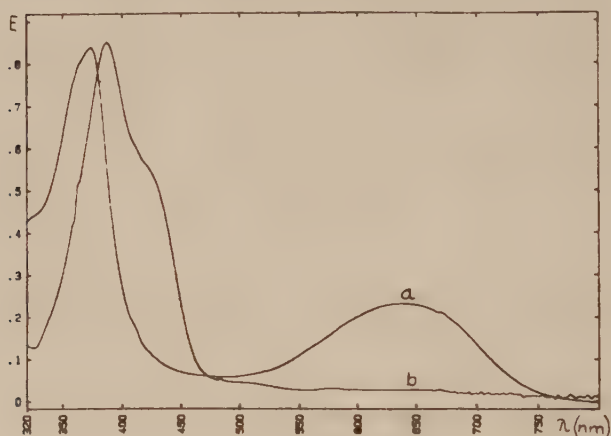
Schema 4: Reaktionsablauf der Z/E- Isomerisierung bei OEBV



Während der Anlagerung des Nucleophils veränderte sich das Absorptionsspektrum des Chromophors deutlich. Das langwellige Maximum des Verdins bei 670nm und die zugehörige Soretbande bei 371nm verschwanden. Parallel dazu entstand eine neue Bande, kennzeichnend für das verkürzte Konjugationssystem des Rubinoids bei 391/420nm (Abb. 1).

Die Lage und Intensität der Rubinoidabsorption wurde durch die Weißlichtbestrahlung nicht beeinflusst (Ausnahme: minimales Ausbleichen). Bei der Photoisomerisation von BR IX α (2) konnte hingegen ein deutlicher hypsochromer Shift, verbunden mit dem Rückgang der Extinktion der Rubinbande, beobachtet werden (STOLL et al., 1979).

Abb. 1: Oktaethylbiliverdin (5) in DMSO; a) vor, b) nach Zugabe von 10 Vol. % 2-Mercaptoethanol



1.1.2.2 Eliminierung des Nucleophils und Aufreinigung der Isomere (Oktaethylbiliverdin)

Die Eliminierung des Nucleophils (Schema 4) mit schwacher Alkalilösung, wie sie FALK et al. (1980) bei Etiobiliverdin-IX γ (4) anwendete, wurde hier durch das schonendere System CHCl₃/10mM KPP (pH=7.5) bzw. H₂O ersetzt. Die Rubinoidlösung wurde dabei zuerst mit ein bis zwei Volumenäquivalenten Wasser bis zum Farbumschlag von Gelb nach Blau verdünnt und das Isomerengemisch des OEBV anschließend durch leichtes Umschwenken in die Chloroformphase übergeführt. Durch ausgiebiges Waschen der organische Phase mit Phosphatpuffer konnte schließlich ein Großteil von DMSO und Mercaptoethanol entfernt werden. Auch während der Extraktion wurde das Reaktionsgemisch so effektiv wie möglich mit Ar bzw. N₂ begast.

Wurde der Extrakt in diesem Reinigungszustand längere Zeit (z.B. über Nacht) stehen gelassen, oder das Volumen (durch Einengen am Rotationsverdampfer) verringert, sank der Anteil

an ZZE- konfiguriertem Verdin rapide ab. Um dies zu verhindern, wurde das Produktgemisch sofort nach dem Trocknen (mit NaCl) über eine Kieselgel- Säule, equilibriert mit CHCl_3 , weiter aufgereinigt.

Durch erschöpfendes Spülen mit Chloroform wurde zuerst DMSO und Mercaptoethanol weiter ausgewaschen. Danach konnte ZZZ-OEBV mit 1% MeOH, gefolgt von ZZE- OEBV mit 2-3% MeOH in CHCl_3 abgetrennt werden. Dieser erste Chromatographieschritt diente nur einer Vorreinigung der Chromophore. Das Gelmateriale erschien nach der Elution des Verdins durch restliches Rubinoid kräftig gelb gefärbt. Dies wurde besonders in den Fällen deutlich, bei denen große Mercaptoethanolüberschüsse eingesetzt wurden. Eine vollständige Eliminierung des Nucleophils ist höchstwahrscheinlich nicht möglich, denn solange noch Reste davon im Reaktionsansatz verbleiben, dürfte es immer wieder zu einer (wenn auch geringen) erneuten Anlagerung an das C-10 Atom kommen. Zudem bindet auch Verdin, wie von FALK und GRUBMAYR (1977) beschrieben, an die OH-Gruppen des Kieselgels, wodurch ebenfalls Rubinoid gebildet wird.

Das Säuleneluat wurde in kleinen Fraktionen (1-2ml) aufgefangen und auf KG- HPTLC Platten mit dem Laufmittelsystem CHCl_3 /1% MeOH chromatographisch untersucht. Die ersten Fraktionen zeigten neben dem unpolaren ZZZ- Isomer (blaugrüner Fleck bei $R_f=0.35$) Verunreinigungen von polaren gelben/braunen Sulfidaddukten, die an oder kurz hinter der Startfront liefen (denkbar durch die Umstellung auf das polarere Lösungsmittel, welches erneut Verunreinigungen von der Säule abtrennt, bzw. ebenfalls Rubinoidbildung bei Bindung an das KG der Platte). Darauf folgten reine ZZZ- Isomere, ZZZ/ZZE- Mischfraktionen und zuletzt "reines" ZZE- Isomer (dunkelblauer Fleck bei $R_f=0.07$). Zusammen mit diesem Isomer wurden jedoch oft zahlreiche gelbe, orange, rote und violette Nebenprodukte gefunden (siehe B. 1.1.3.5), die in der DC knapp vor oder hinter ihm liefen. Diese Produkte wurden nicht näher charakterisiert. Sie entstanden wahrscheinlich zum Teil während Photoumwandlung und Extraktion, wenn die Pigmentlösung zu lange dem Luftsauerstoff ausgesetzt wurde, oder auch erst während dem Auftragen der Proben auf die KG- Schicht der DC- Platte beim Antrocknen. Aus diesem Grund wurde die Trennung der Isomeren auch nicht mehr über präparative Schicht-, sondern nur noch über Säulenchromatographie durchgeführt. Um den Einfluß von Sauerstoff auch bei der analyti-

schen DC weiter auszuschalten, wurde während dem Auftragen der Fraktionen mittels einer Pasteurpipette Argon in einem leichten Strom über die Platte geleitet.

In den meisten Fällen wiesen die aufgefangenen Fraktionen nach der ersten Säulenchromatographie noch einen deutlichen Sulfidgeruch, der auf Reste von Thiol schließen ließ, auf. Sie wurden deshalb, entsprechend der Isomerenverteilung, gepoolt und zur Endreinigung erneut an KG chromatographiert. Um eine größtmögliche Abtrennung der ZZE- Isomeren von unerwünschten Nebenprodukten zu gewährleisten, wurde diese in langen dünnen Säulen durchgeführt und erneut nur kleine (ca. 1ml) Fraktionen aufgefangen. Nach spektroskopischer und dünnschichtchromatographischer Reinheitsüberprüfung wurden die Isomere zur Trockene eingengt und unter Argon dunkel und tiefgekühlt aufbewahrt. In diesem Stadium konnten sie über längere Zeit stabil erhalten werden.

Durch die intensive Reinigung mußten entsprechende Materialverluste in Kauf genommen werden. Die quantitative Ausbeute, bezogen auf die eingesetzte Verdinmenge, betrug 31% ZZZ- und 9.5% ZZE- OEBV.

1.1.2.3 Abweichung von den standardisierten Reaktionsbedingungen (Oktaethylbiliverdin)

Die Reinigung der Isomeren wurde durch zwei Faktoren beeinträchtigt:

Der Erste lag in der Schwierigkeit, Mercaptoethanol vollständig abzutrennen. Wahlweise wurde es deshalb durch Ethylmercaptan ersetzt. Dieses Thiol verfügt über ähnliche nucleophile Eigenschaften, hat aber gegenüber Mercaptoethanol den Vorteil eines wesentlich niedrigeren Siedepunkts (35 resp. 157°C). Zur Addition an C-10 wurde es im selben Verhältnis wie Mercaptoethanol zugegeben. Nach der Belichtung wurde es durch Zugabe von H₂O zur Reaktionsmischung eliminiert und im Vakuum am Rotationsverdampfer (25°C Wasserbadtemperatur) quantitativ abgezogen. Das Isomerengemisch wurde wie üblich extrahiert, gereinigt und getrennt. Die Ausbeute von 12.7% ZZE- OEBV lag geringfügig höher als bei Verwendung von Mercaptoethanol (konnte aber nicht ausschließlich auf diesen Umstand zurückgeführt werden).

Als zweites Problem erwies sich das Lösungsmittel DMSO. Wie das Thiol ließ es sich nur sehr schwer aus der organischen

Phase abtrennen. Als störend erwies es sich vor allem bei der Chromatographie, indem es eine ungenügende Bindung an das KG und, verbunden damit, eine unvollständige Trennung der Isomere bewirkte. Es wurde deshalb versucht, DMSO durch MeOH zu ersetzen. Die Additionsreaktion ließ sich mit Mercaptoethanol problemlos durchführen, dabei reichten schon 1.5 Vol. % Thiol aus, um 10mg Verdin binnen 5min quantitativ umzusetzen. Das Additionsprodukt zeigte Absorptionsmaxima bei 425nm sowie 389nm. Durch die Weißlichtbestrahlung wurde der längerwellige Peak zu einer (ausgeprägten) Schulter in der 389nm- Absorptionsbande reduziert. Zusätzlich ging die Intensität geringfügig (5%) zurück, was aber nicht eindeutig einer Änderung des Extinktionskoeffizienten oder einer reinen Ausbleichreaktion zugeordnet werden konnte. Belichtung, Eliminierung, Extraktion und Reinigung wurden wie bei Verwendung von DMSO als Lösungsmittel durchgeführt. Dabei zeigte sich jedoch, daß im Verhältnis weit mehr (sowohl mengen- als auch zahlenmäßig) Nebenprodukte entstanden waren und die chromatographische Reinigung erschwerten. Die Ausbeute betrug nur knapp 5% für ZZZ- und 11.8% für ZZE- OEBV.

1.1.2.4 Reaktionsablauf bei der Isomerisierung von Dihydro-oktaethylbiliverdin

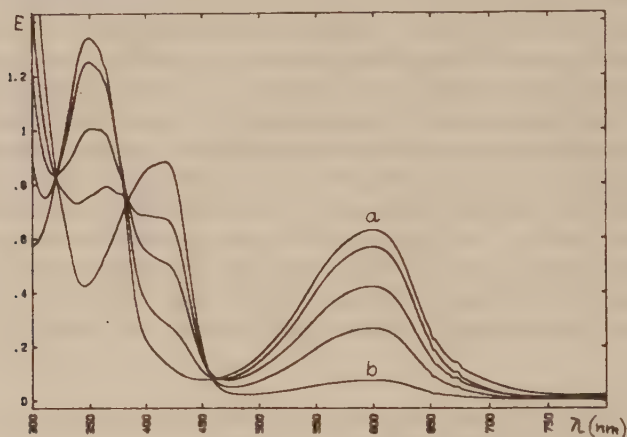
Die Durchführung der Addition, Isomerisation und Reinigung von DHOEBV erfolgte im wesentlichen wie bei OEBV (siehe C. 2.2.2). Die Umsetzung zum Rubinoid erforderte jedoch weit größere Mercaptoethanolmengen und war scheinbar trotzdem nicht quantitativ möglich (Abb. 2). Es blieb immer eine Restabsorption bei 600nm vorhanden. Ein Anteil von 20 Vol. % Thiol ergab eine, nach Beendigung der Reaktion, hellgrüne Lösung, die zur Photoumwandlung mit Weißlicht belichtet wurde. Es erschien nicht ratsam, noch höhere Thiolkonzentrationen einzusetzen. Es war besser, weniger Rubinoid und damit photoisomerisierbares Edukt vorliegen zu haben, denn im Endeffekt ergab sich eine bessere ZZE- Ausbeute, da weniger unerwünschte Nebenprodukte entstanden waren.

Das Absorptionsspektrum des Rubinoids von DHOEBV in DMSO zeigte ein Maximum bei 408nm mit einer leichten Schulter um 310nm (Abb. 2b). Die Bande blieb bei Belichtung unverändert. Eine analoge Additionsreaktion ergab sich auch bei Verwendung von 20 Vol. % Ethylmercaptan als Nucleophil.

Nach der Extraktion mit CHCl_3 /10mM KPP wurde das Isomere gemisch sofort auf eine KG- Chromatographiesäule aufgebracht.

DHOEBV erwies sich als empfindlicher als OEBV (größere Anzahl an Abbauprodukten, hohe Rückisomerisierungsrate). Aus diesem Grund mußten die Lösungen stets ausreichend mit Argon begast und Kolben/Säule etc. zusätzlich gegen (Grün-) Licht geschützt werden.

Abb. 2: Dihydrooktaethylbiliverdin in DMSO; a) vor, b) nach Zugabe von 15 Vol. % 2-Mercaptoethanol



Da DHOEBV unpolarer war als OEBV, konnte das ZZZ- mit 0 bis 0.5% MeOH, das ZZE- Isomer mit 2% MeOH in CHCl_3 eluiert werden. Die analytische Dünnschichtchromatographie auf KG im System NP, CHCl_3 /2.5% MeOH ergab für den ersten Reinigungsschritt folgende Fraktionierung: grüner Vorlauf ($R_f=0.88$), ZZZ- Isomer mit violetter Verunreinigung ($R_f=0.84$), ZZZ- ($R_f=0.83$), ZZZ- mit polareren grünen, gelben und violetten Verunreinigungen ($R_f=0.7-0.3$), sowie ZZE- ($R_f=0.16$). Das ZZE- Isomere wurde von einer großen Anzahl (6 bis 8) gelber, roter und violetter Verunreinigungen begleitet, deren R_f -Werte sich nur minimal voneinander unterschieden.

Bereits im ersten Chromatographieschritt konnte der Hauptanteil des ZZZ- Isomers in reiner Form abgetrennt werden. Für die Aufreinigung des ZZE- Produkts schloß sich eine zweite Kieselgelchromatographie an. Dabei wurden die unpolareren Nebenprodukte mit 0-1% MeOH in CHCl_3 ausgespült. Mit 1.5% MeOH konnte ein größerer ZZE- Anteil rein erhalten werden, gefolgt von mit 2% MeOH eluiertem ZZE- mit polareren roten/grünen Verunreinigungen. Die Abbauprodukte wurden, wie bei OEBV, nicht näher bestimmt. Auch die Art und Anzahl dieser

Verbindungen, die je nach Aufarbeitung oder z.B. auch längerer Lagerzeit, unterschiedlich auftraten, wurde nicht genauer untersucht (siehe B. 1.1.3.5).

Da sich die Z/E- Isomere von DHOEBV in ihrer Polarität untereinander stärker unterschieden als die des OEBV, waren sie auch durch Chromatographie leichter zu trennen. Das zeigte sich in geringeren Verlusten nach beendeter Reinigung. Die Ausbeute von ZZZ- DHOEBV lag bei 45%, die des ZZE- Chromophors bei rund 5%. Das Verhältnis von Z zu E war damit jedoch deutlich schlechter als bei OEBV (siehe B. 1.1.2.2, E- Isomere empfindlicher!). Nach Aufreinigung erwiesen sie sich jedoch bei dunkler und kalter Lagerung ebenso stabil.

(Die DC auf HPTLC- Platten diente nur der qualitativen Reinheitskontrolle der OEBV/DHOEBV- Isomere. Die Rf- Werte wurden meist nicht bestimmt, da sie durch zahlreiche Faktoren (z.B. Plattengröße, häufigere Verwendung der Platten nach Reinigung in Aceton, etc.) Schwankungen unterworfen waren. Die Ausbeuten bei der Präparation von OEBV und DHOEBV Isomeren wurden nur in wenigen Fällen bestimmt, da die sauberen Fraktionen für Messungen sofort verwendet, die stärker verunreinigten verworfen, oder mit denen anderer Präparationsansätze vereinigt und je nach Bedarf zu späteren Zeitpunkten aufgereinigt wurden.)

1.1.3 Eigenschaften der Konfigurationsisomere

1.1.3.1 Spektrale Unterschiede

OEBV (5) und DHOEBV (6) liegen in Lösung (z.B. MeOH, CHCl₃) in all- syn, all- Z Konfiguration vor. Daraus ergibt sich die typisch helikale Konformation der "freien" Verdinchromophore (FALK und MÖLLER, 1983d). Aus dieser Struktur resultieren die charakteristischen Absorptionsspektren dieser Verbindungen: eine breite, unstrukturierte Bande von niedriger Intensität im sichtbaren Absorptionsbereich (bedingt durch viele Konformere), sowie eine hohe S₂- Bande im UV-Gebiet. Die Lage der S₁- Bande wird durch die Zahl der konjugierten Doppelbindungen im Tetrapyrrolskelett bestimmt. ZZZ- OEBV, bei dem die π - Elektronen über alle vier Pyrrolringe "verschmiert" sind, absorbierte in Methanol im Bereich von 650nm (Tabelle 1). Die Absorption von ZZZ-DHOEBV, dessen Konjugationssystem um eine Doppelbindung verkürzt ist, lag bereits stark hypsochrom verschoben bei ca. 600nm.

Tabelle 1: Absorptionsunterschiede von DHOEBV/OEBV- Konfigurationsisomeren in Abhängigkeit vom Lösungsmittel

LM	ZZZ- OEBV	ZZE- OEBV	ZZZ- DHOEBV	ZZE- DHOEBV
	ϵ (ϵ^1)	ϵ (ϵ^1)	ϵ (ϵ^1)	ϵ (ϵ^1)
MeOH	652(15600) ² 367(51200) ² 320Sh	624(15800) 367(44600) 300Sh	595(17600) ² 348(39400) ² 276Sh	575(18900) 350(37200) 276Sh
CHCl ₃	650(15000) 370(51800) 305Sh	602(18000) 368(45200) 325Sh	592(17800) 352(39700) 280Sh	550(23700) 352(28800) 280Sh
DMSO	674 372 305Sh	610 369 330Sh	600 352 278Sh	570 352 278Sh

1) ϵ ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$)

2) Extinktionskoeffizienten bestimmt: SCHEER (1976)

Alle anderen ϵ - Werte wurden auf spektroskopischem Weg auf der Grundlage der Methanolwerte von ZZZ- OEBV/DHOEBV ermittelt.

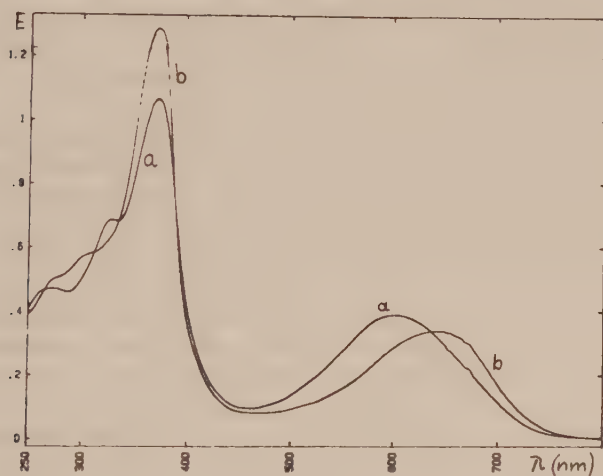
Durch die Konfigurationsänderung bei der Photoisomerisierung an einer Methinbrücke wird ein Ring um 120° (Konfigurationsanalyse: FALK et al., 1984a) aus der Ebene der übrigen herausgedreht. Damit öffnet sich die zyclische Anordnung des Chromophors, es entsteht eine partiell gestreckte Konformation. Diese Strukturänderung beeinflusst die Verteilung der π - Elektronen über den gesamten Chromophor in ähnlicher Weise, als wäre das Konjugationssystem unterbrochen worden.

Deshalb unterscheiden sich auch ZZZ- und ZZE- Konfigurationsisomere in der Lage ihrer Absorptionsbanden (Tabelle 1, 3) deutlich. Das quasi verkürzte Konjugationssystem bewirkt eine hypsochrome Verschiebung der langwelligen Maxima (Abb. 3a, b). Im Falle des OEBV waren dies bis zu 50nm (CHCl₃: 650nm/ZZZ, 602nm/ZZE), bei DHOEBV nahezu 40nm (CHCl₃: 592nm/ZZZ, 550nm/ZZE; Abb. 11). Die zugehörige Soretbande blieb von diesen Änderungen relativ unbeeinflusst. Sie lag in OEBV (CHCl₃: 370nm/ZZZ, 368nm/ZZE) bathochrom verschoben gegenüber DHOEBV (CHCl₃: 352nm/ZZZ, ZZE).

Die Strukturänderung der Chromophore wurde auch deutlich in der Änderung der Bandenintensitäten bzw. Extinktionskoeffizienten (Tabelle 1). Die geschlossene, helicale Konformation in den ZZZ- Isomeren wurde durch niedrige ϵ - Werte im langwelligen und hohe ϵ - Werte im UV- Bereich gekennzeichnet.

Die Erhöhung der Bandenintensität nach der Z/E- Photokonversion von OEBV/DHOEBV im Langwelligen wies auf eine Streckung des Chromophors hin. Zugleich fand eine umgekehrte Änderung bei den Soretintensitäten statt, die in ZZE- konfiguriertem Zustand deutlich niedriger lagen als bei ZZZ. Demzufolge war auch der Quotient Q_{vis}/Q_{uv} für ZZE höher (OEBV in MeOH: 0.33) als für ZZZ (MeOH: 0.28; Tabelle 3).

Abb. 3: Absorption von Oktaethylbiliverdin in Chloroform:
a) ZZE (aus der Isomerenpräparation, siehe 1.1.2.1),
b) ZZZ (nach sättigender Weißlichteinstrahlung)



Die Absorptionsmaxima der Chromophore von DHOEBV und OEBV (beide Isomere) zeigten eine deutliche Abhängigkeit vom umgebenden Lösungsmittel (siehe Tabelle 1 bis 3).

Wasserstoffbrückenbindungen mit ihren schwachen Wechselwirkungen tragen wesentlich zur Stabilität von Helix- Konformeren der Bilatriene- und 2,3- Dihydrobilatriene- a,b,c bei (FALK et al., 1985). Je nach Konfiguration und der Tendenz des Lösungsmittels zur Bildung von Wasserstoffbrücken ändert sich die Konformation und dadurch die Absorption der Chromophore.

Besonders auffällig war das extrem langwellig verschobene Absorptionsmaximum von ZZZ- OEBV im polar aprotischen Solvens DMSO. Mit 674nm lag es weit außerhalb des Bereiches von z.B. polar protischem MeOH (652nm), unpolarerem CCl_4 (658nm) bzw. Dioxan (652nm), oder schwach polarem $CHCl_3$ (650nm). Dieses Verhalten in DMSO wurde darauf zurückgeführt, daß der

ZZZ- Chromophor in diesem Lösungsmittel (starke Wasserstoffbrücken zum LM) eine stärker helikal geschlossene Konformation einnimmt als in anderen Solventien.

Dementsprechend zeigte auch der gestrecktere ZZE- Chromophor in DMSO eine Absorption bei 610nm, die von anderen Lösungsmitteln nicht so stark (CHCl_3 : 602nm, CH_2Cl_2 : 609nm) abwich. Dagegen lag sie jedoch im polar protischem Medium (z.B. MeOH) stärker bathochrom verschoben bei 624nm.

Die Wirkung von Dimethylsulfoxid auf DHOEBV erschien ebenfalls weit weniger ausgeprägt. Das Absorptionsmaximum lag für ZZZ mit 600nm im Bereich protisch polarer (MeOH: 595nm) und unpolarer (Dioxan: 590nm) Lösungsmittel. ZZE absorbierte am kurzwelligsten in schwach polarer Umgebung (CHCl_3 : 550nm), in DMSO bei 570nm und in MeOH bei 575nm.

Eine gegenteilige Wirkung zu DMSO übt HMPT auf Chromophore dieses Typs aus (FALK et al., 1985). HMPT weist unter allen aprotischen dipolaren Lösungsmitteln die ausgeprägteste Tendenz zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken auf.

Lineare ungesättigte Tetrapyrrole wie das Etiobiliverdin-IX $\uparrow$ (4) liegen darin z.T. in einer veränderten Konformation vor, ausgedrückt durch eine deutliche hypsochromen Verlagerung der langwelligen Absorptionsbande (14nm gegenüber CCl_4), und zugleich einer Änderung des Intensitätsverhältnisses von langwelliger zu kurzwelliger Bande (Q_{vis}/UV : CCl_4 : 0.33, HMPT: 0.63). Noch deutlicher wird das Absorptionsspektrum bei 2,3- Dihydrobilatrienen (z.B. 3) in oben genannter Weise verändert (Maximum liegt 20nm kürzerwellig, Q_{vis}/UV : CCl_4 : 0.48, HMPT: 1.1).

Das Gleichgewicht wird vor allem beim Dihydrosystem durch HMPT zur Seite der gestreckten Geometrie (4 syn- Z, 10 anti- Z, 15 syn- Z; FALK et al., 1985) hin verschoben.

OEBV und DHOEBV zeigten dagegen deutlich unterschiedliches Verhalten in diesem Solvens. Das Maximum für ZZZ- OEBV lag bei 636nm (CCl_4 : 657nm) und wies zusätzliche Schultern ($\approx 580\text{nm}$, $\approx 700\text{nm}$) auf, die in den geläufigen Lösungsmitteln (z.B. Aceton, CHCl_3 , CCl_4 etc.) nicht auftraten (Abb. 4a, b). Das Intensitätsverhältnis von sichtbarer- zur UV- Bande änderte sich ebenfalls gravierend (CCl_4 : 0.29, HMPT: 0.6) und bestätigte die bevorzugte gestrecktere Konformation des Chromophors in diesem Milieu.

Für DHOEBV (6) ergab sich (im Gegensatz zu den Untersuchungen am Dihydrosystem von FALK et al. (1985) ein völlig aty-

gisches Spektrum (Doppelmaximum bei 650, 710nm) mit längerwellig verschobenen Hauptbanden, die eine dem protonierten Zustand vergleichbare Struktur (HMPT schwach sauer, $\text{pH} \approx 4-5$; Abb. 5a, b) und nicht eine gestreckte vermuten ließen.

Abb. 4: ZZZ- OEBV (5) in a) Aceton und b) HMPT

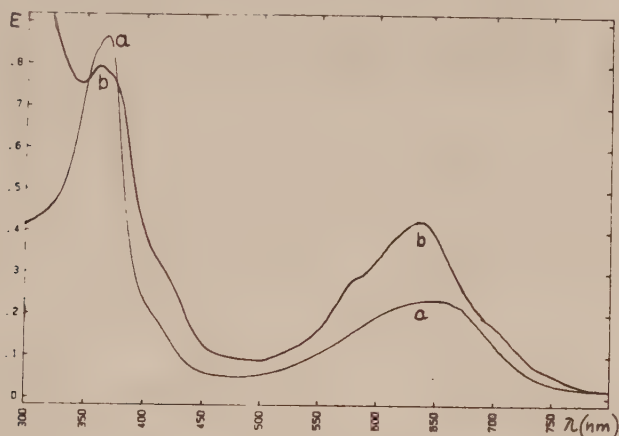
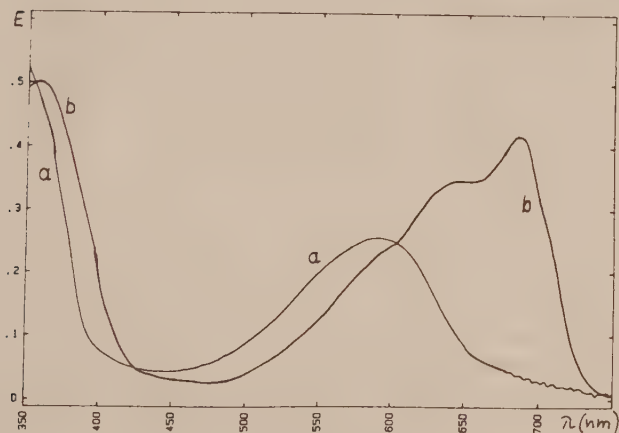


Abb. 5: ZZZ- DHOEBV (6) in a) Aceton und b) HMPT



Durch Protonierung/Deprotonierung verschoben sich die Absorptionsmaxima der Tetrapyrrolchromophore ebenfalls deutlich (Tabelle 2).

Wurde ZZZ- OEBV in unpolarem Benzol mit 1N Salzsäure titriert (2.5ml Chromophorlösung unterschichten mit 5 - 200 μl

Tabelle 2: Spektrale Unterschiede von ZZZ- OEBV/DHOEBV- Kationen im Vergleich zur freien Base

Solvens	Absorption (Extinktion) /(nm)	$\epsilon_{vis} / \epsilon_{uv}$
OEBV		
CHCl ₃	650(0.197), 370(0.693), 305Sh	0.28
CHCl ₃ /Hac	664(0.204), <Sh620 ¹ , 369(0.639)	0.32
CHCl ₃ /HCl	694(0.488), <Sh660, 369(0.823)	0.59
CHCl ₃ /Tfa	690(0.411), >Sh640, 364(0.821)	0.50
DMSO	674(0.207), 372(0.87), 305Sh	0.24
DMSO/Tfa	695(0.405), <Sh650, <390Sh, 370(0.68)	0.59
DMSO/KOH	705(0.16), <Sh650, n.b.	n.b.
Benzol	650(0.344), 366(1.11)	0.31
Benzol/HCl	716, 676(0.97), 371(1.388)	0.69
Benzol/Tfa	>Sh685, 636(0.655), 362(1.1)	0.60
DHOEBV		
Ether	591(0.594), 338(1.341), 262	0.44
Ether/HCl	671(1.518), >Sh641, 351(1.26), 330Sh, 267	1.2
Ether/Tfa	628(1.268), 348(1.291), 263	0.98
CH ₂ Cl ₂	603(0.548), >Sh671, 348(1.242), 263	0.44
CH ₂ Cl ₂ /HCl	671(1.284), <Sh635, 368(1.103), Sh333, 265	1.16
CH ₂ Cl ₂ /Tfa	656(1.157), <Sh635, 363(1.178), 345Sh, 265	0.98
DMSO	602(0.576), 348(1.23), 263	0.47
DMSO/HCl	666(1.202), <Sh626, 361(1.192), Sh335, 267	1.01
DMSO/Tfa	669(1.199), <Sh635, 361(1.20), Sh338, 266	1.0
Aceton	594(0.096), 342(0.212)	0.45
Aceton/Tfa	664(0.185), <625Sh, 354(0.193)	0.96

1) kleine (<Sh) bzw. ausgeprägte (>Sh) Schulter

Säure; H₂O zu 1% in Benzol löslich), verschob sich das langwellige Absorptionsmaximum kontinuierlich von 650 nach 664nm. Zugleich bildete sich eine deutliche Schulter an der langwelligen Flanke aus. Mit dem Zusatz von weiteren 200µl konzentrierter HCl stellte sich das endgültige Kationenspektrum (λ_{max} =716nm mit ausgeprägter Schulter um 676nm) ein. Dabei stieg der Extinktionskoeffizient (Intensität) dieser Doppelbande auf das Dreifache an. Die Veränderung an der UV-Absorption war weniger drastisch (Tabelle 2).

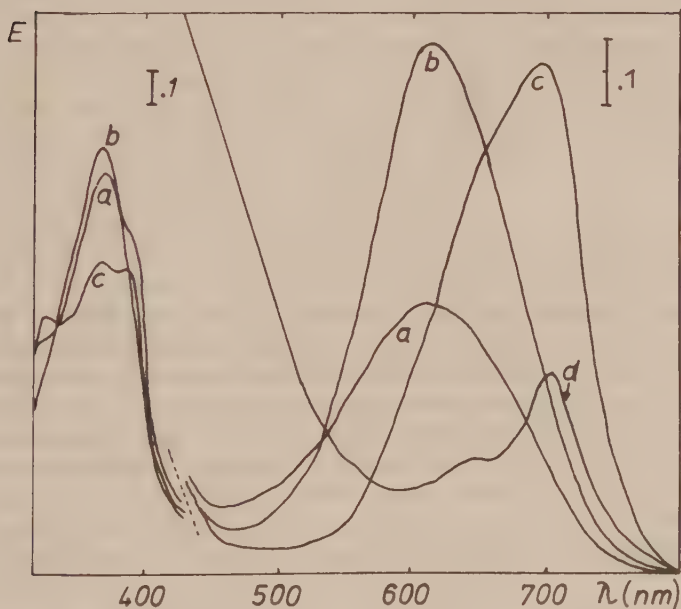
In Trifluoressigsäure lag das Hauptmaximum hingegen etwas kürzerwelliger und bildete eine Schulter um 685nm aus.

Entsprechende Wellenlängenverschiebungen waren auch in ande-

ren Lösungsmitteln mit verschiedenen Säuren zu beobachten. Im Gegensatz zu HCl und Tfa konnte mit der schwachen Essigsäure nur eine partielle Protonierung erreicht werden.

Die pK- Werte für OEBV und DHOEBV liegen bei 5.1 bzw. 5.55 (bestimmt durch Titration in MeOH mit wässrigem Guadiniumhydrochlorid- Puffer von SCHEER, 1976). Die qualitative Änderung der Absorptionsspektren bei der Bildung der DHOEBV-Kationen war vergleichbar zum ungesättigten Chromophor. Das Maximum verschob sich um ca. 50nm längerwellig, die Intensität der Bande wurde verdoppelt (Tabelle 2).

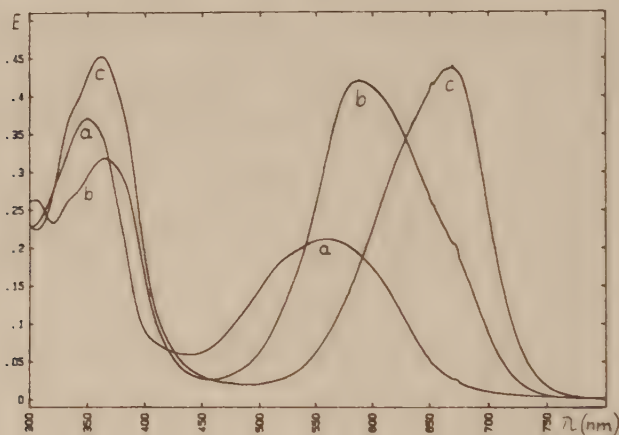
Abb. 6: ZZE- OEBV in DMSO: a) vor, b) nach Ansäuern mit 1 Vol. % Trifluoressigsäure, c) ZZE- Kation 10sec mit Weißlicht bestrahlt, d) ZZE- OEBV nach Zugabe von 5 Vol.% 2N KOH



Die Protonierung der Z/E- isomeren OEBV- Chromophore hatte eine unterschiedlich starke bathochrome Verschiebung der langwelligen Absorptionsbande zur Folge (Abb. 6). Sie betrug 21nm für das ZZZ-, aber nur 4nm für das ZZE- Isomer in DMSO. Zugleich verdoppelte sich die Extinktion der Bande. Das 15E-konfigurierte OEBV zeigte als freie Base eine UV- Absorption

bei 371nm, durch Ansäuern wurde das Maximum zweigipflig (370, 386nm). Im protonierten Z- Isomer war nur eine schwache langwellige Schulter in der 371nm-Bande erkennbar. Ähnliche bathochrome Verschiebungen ergaben sich beim Ansäuern von ZZE- DHOEBV mit Tfa in CHCl_3 (ZZE: 587nm, 361nm; ZZZ: 669nm, 361nm; Abb. 7). Die Intensität des langwelligen Maximums wurde verdoppelt.

Abb. 7: ZZE- DHOEBV in CHCl_3 : a) vor, b) nach Ansäuern mit 1 Vol. % Trifluoressigsäure, c) ZZE- Kation 10sec mit Weißlicht bestrahlt



Diese Beobachtungen entsprachen den Ergebnissen an Dihydrobilatrienen von FALK et al. (1984). Protonierung von (7) in DMSO ergibt für ZZZ- eine Verschiebung der langwelligen Absorptionsbande um 50nm unter Verdoppelung der Intensität, die UV- Absorption verschiebt sich geringfügig längerwellig (Intensität um $\approx 8\%$ verringert). Das ZZE- Isomer verschiebt sich nur 20nm längerwellig unter starker Erhöhung der Intensität (≥ 2.5 fach); die UV- Bande ändert ihre Lage nicht (Intensität um $\approx 20\%$ verringert).

Untersuchungen des Deprotonierungsverhaltens bei Pyrromethenonen von FALK und ZRUNEK (1983c) ergaben, daß die Deprotonierung bei 2,3- Dihydropyrromethenonen gegenüber dem ungesättigten System bevorzugt wird. Daraus ergab sich der gesättigte Lactamring als bevorzugter Deprotonierungsort. Dies ließ sich auch in ähnlicher Weise auf 2,3- Dihydrobilatriene a,b,c übertragen (SCHEER, 1976). Nur wenn die Deprotonierung des ungesättigten Ringes durch Blockierung (z.B. N- Alkylierung)

rung) unmöglich ist, verhält sich der Chromophor wie normale Bilatriene (Deprotonierung an N-24; FALK und ZRUNEK, 1983c). Titriert man (7) in DMSO mit Base, erweist sich das azide Proton im gesättigten Ring A als primärer Ort der Deprotonierung. Innerhalb eines pK_a -Bereiches von 10-20 kommt es zu keinem zweiten Protonenentzug. Das Anion wird durch die Delokalisierung der negativen Ladung auf C-10, und die bestehenden Wasserstoffbrücken stabilisiert. Daraus resultiert auch die unterschiedliche Stabilität der Diastereomeren. Das Anion des ZZE- Isomers ist durch die Verzerrung der Gesamtgeometrie und die verringerte Anzahl Wasserstoffbrücken extrem instabil und nicht isolierbar (siehe B. 1.1.3.3), Lebensdauer ca. 500ms (FALK und ZRUNEK, 1983c).

Die Absorptionsunterschiede bei der Bildung des Anions zeigen deutliche Differenzen zwischen 2,3- Dihydrobilatrienen und den ungesättigten Chromophoren. Während sich das langwellige Maximum von Etiobiliverdin IXr (4) unter Verdoppelung der Intensität von 656 auf 711nm verschiebt, weist (7) einen erheblich größeren Shift von 592 auf 770nm auf, wobei die Intensität nur um das 1.4 fache ansteigt (Erweiterung der Konjugation). Aus der Lage des ZZZ- Maximums von (7) bei 775nm wurde die Absorption für das zugehörige ZZE- Isomer mit 762nm bestimmt (FALK und ZRUNEK, 1983c).

Das Anion des OEBV's (5) wurde durch Zugabe von KOH zu in DMSO gelöstem Pigment erzeugt. Dabei schlug die Farbe von blau nach braun um, zugleich wurde die Lösung deutlich trüb. Das Absorptionsmaximum verschob sich längerwellig nach 705nm mit einer leichten Schulter um 650nm (DMSO, Abb. 6). Zwischen E- und Z- Isomer war kein Unterschied erkennbar. Im deprotonierten Zustand kam es auch bei OEBV zu einer sofortigen E/Z- Reversion (siehe B. 1.1.3.3).

1.1.3.2 Abhängigkeit der E/Z- Photoreversion vom Lösungsmittel

Die Belichtungsversuche an den ZZE- Isomeren von OEBV und DHOEBV wurden durchwegs in Küvettenansätzen bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Substanz wurde im jeweiligen Lösungsmittel aufgenommen und in der verschlossenen Küvette, jedoch nicht unter Sauerstoffausschluß, aus 5-10cm Entfernung mit Weißlicht belichtet. Unmittelbar anschließend wurden Absorptions- bzw. Absorptionsdifferenzspektren aufgezeichnet.

Sowohl vor als auch nach der Belichtung wurden die Proben dünn-schichtchromatographisch auf ihre Reinheit (Isomerenanteil, Abbauprodukte) geprüft.

Tabelle 3: Z/E- Isomerisierung von OEBV/DHOEBV- Chromophoren in unterschiedlichen Lösungsmitteln

-OEBV

LM	$\lambda_{\max}$ (ZZE) (nm)	hv ¹ (s)	$\lambda_{\max}$ (ZZZ) (nm)	Qvis : uv ²	isosbestische Punkte ³ (nm)
CH ₂ Cl ₂	609,370,325S	42	647,370,305	0.34/0.26	640, ≈390,310
CHCl ₃	602,368,325S	41	648,370,305S	0.35/0.27	630, ≈400,310
	602,368,325S	120	648,371,305S	0.36/0.28	630, ≈410,310
CCl ₄	600,369,325S	15	657,370,300S	0.34/0.29	634, ≈390, ≈315
Dioxan	600,370,305S	105	650,370,305	0.34/0.29	630, ≈390, ≈310
Benzol	604,370,326	60	645,369,	0.31/0.27	628,332
DMSO	614,371,330S	60	676,371,300S	0.53/0.38	652, ≈420
MeOH	622,367,320S	340	652,367,300S	0.33/0.28	642, ≈390,310

-DHOEBV

LM	$\lambda_{\max}$ (ZZE) (nm)	hv ¹ (s)	$\lambda_{\max}$ (ZZZ) (nm)	Qvis : uv ²	isosbestische Punkte ³ (nm)
CHCl ₃	550,352,280	35	592,352,280	0.63/0.42	580, ≈390, ≈320
Dioxan	562,345,278	100	590,343,278	0.51/0.43	580, ≈380,310
DMSO	570,352,278	60	600,352,278	0.5/0.43	580, ≈390,300
MeOH	575,350,276	60	595,348,276	0.49/0.43	595, ≈390,324

- 1) Belichtung mit Weißlicht (sec), Leitz Projektor (siehe C 1.5)
- 2) Extinktionsverhältnis S₁/S₂ vor/nach Belichtung
- 3) isosbestische Punkte bzw. Bereiche bei der Photoumwandlung
- 5) Schulter

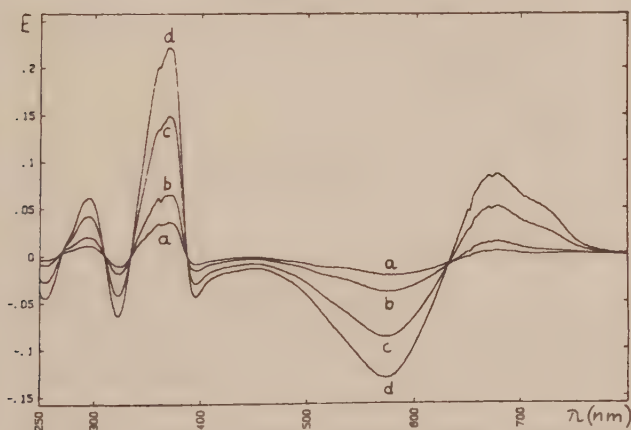
Wurde OEBV in CHCl₃ aufgenommen, erhielt man eine hellblaue Lösung mit Absorptionsmaxima bei 602nm und 368nm, sowie einer kurzwelligen Schulter bei 325nm (Tabelle 3). Das Intensitätsverhältnis der sichtbaren- zur UV- Bande betrug 1:2.8. Durch schrittweise Belichtung der Chromophorlösung verschob sich das Maximum langsam längerwellig.

Gleichzeitig ging die Intensität der Bande zurück (Mischungsverhältnis der Isomere ändert sich kontinuierlich zugunsten von ZZZ). Nach 50sec lag das Absorptionsmaximum bei

639nm, die Gesamtextinktion der Lösung betrug noch 92% der unbelichteten Probe. Weitere Bestrahlung führte zu einer langwelligen Verschiebung bis auf 648nm, parallel dazu stieg die Intensität der Bande (Hauptanteil jetzt ZZZ) wieder geringfügig (auf 94.3% der unbelichteten Probe) an. Nach 120sec war keine weitere Veränderung (Lage des Maximums, Intensität) mehr zu beobachten. Die Farbe der Lösung hatte sich jedoch deutlich verändert: dunkelblau bis blaugrün (je nach Konzentration).

Neben der deutlichen Verschiebung des sichtbaren Maximums lag die Soretbande nach abgeschlossener Belichtung bei 371nm gegenüber 368nm in der unbelichteten Lösung. Ihre Intensität stieg jedoch während der Photoreaktion stetig an (17.6%) und es kam ebenfalls zu einer Verschiebung der Schulter in der kurzwelligen Flanke von 325nm (ZZE) nach 305nm (ZZZ). Das Verhältnis der Extinktionen von $S_1:S_2$ betrug nun 1:3.55.

Abb. 8: Absorptionsdifferenzspektrum von ZZE- OEBV minus des a) 10sec, b) 20sec, c) 60sec, d) 120sec mit Weißlicht bestrahlten Isomers in $CHCl_3$



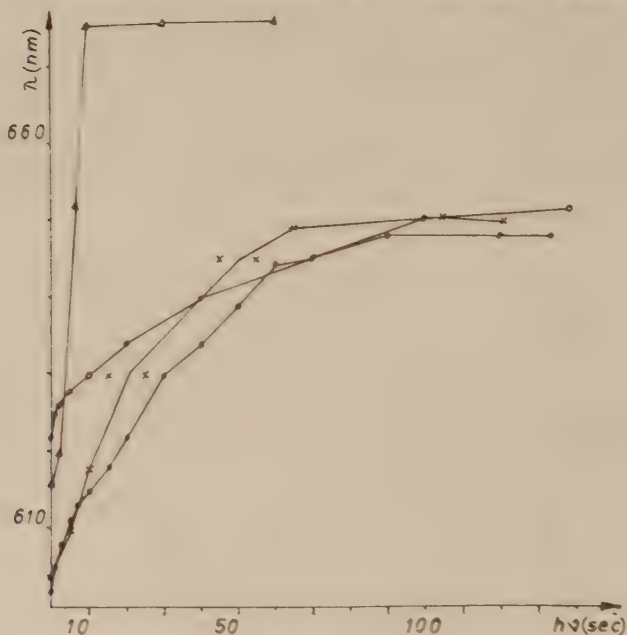
Die Verschiebung der Absorptionsbanden, sowie die Änderung der Intensitäten, zeigten sich besonders deutlich im Differenzspektrum (Abb. 8) des unbelichteten (ZZE) zum belichteten (ZZZ) Chromophor.

Die DC- Kontrolle zeigte einen Fleck bei $R_f=0.21$ ($CHCl_3/2\%$ MeOH) für ZZE vor, und nur einen Fleck bei $R_f=0.75$ für ZZZ nach Ende der Weißlichtbestrahlung. Es fand eine vollständige Reversion des Photoisomeren in das stabilere ZZZ statt, dabei wurden keine Zwischen- oder Neben- (Photooxidations-)

produkte gefunden. Das Endprodukt der Belichtung war spektroskopisch und chromatographisch identisch zu unbehandeltem ZZZ- OEBV.

Die Belichtung der ZZE- OEBV Isomeren in anderen Lösungsmitteln (Abb. 9, Tabelle 3) ergab analoge Reaktionsabläufe unter Berücksichtigung der unterschiedlichen, vom Solvens abhängigen, Lage der Absorptionsmaxima.

Abb. 9: Abhängigkeit der E/Z- Reversion bei OEBV von Lösungsmittel und Belichtungsdauer: Verschiebung des Absorptionsmaximums während der Isomerisierung in: ".": CHCl_3 , "x": Dioxan, "o": Methanol, "Δ": DMSO



Es wurde jedoch auch deutlich, daß unterschiedliche Bestrahlungszeiten für die Sättigung der E/Z- Umwandlung, je nach Lösungsmittel, notwendig waren. Sie lagen bei ca. 160sec in polar protischem MeOH, bei ca. 100sec in CHCl_3 oder Dioxan. Mit hoher Quantenausbeute lief die Photoumwandlung in DMSO ab, bereits nach 10sec konnte keine weiteren Änderungen mehr beobachtet werden. Daran ließ sich erneut die starke Stabilisierung der geschlossenen ZZZ- im Vergleich zur gestreckten ZZE- Konformation in diesem polar aprotischen Milieu erkennen.

Eine weitere interessante Feststellung konnte bei der E/Z-Reversion in unpolarem Benzol getroffen werden. Unter den gewählten Bedingungen war die Photoumwandlung nach $\approx 100\text{sec}$ beendet. Wurde ZZE- OEBV jedoch unter Argon mit Weißlicht bestrahlt, konnte noch nach zwei Stunden dünn-schichtchromatographisch ein geringer ZZE- Anteil (neben mehreren Abbau- produkten) nachgewiesen werden. Bei partiellem Sauerstoff- ausschluß schien das ZZE- Konfigurationsisomere im unpolaren Milieu stabilisiert zu sein, was auf Beteiligung von Tripletzuständen bei der Isomerisierung hindeuten könnte.

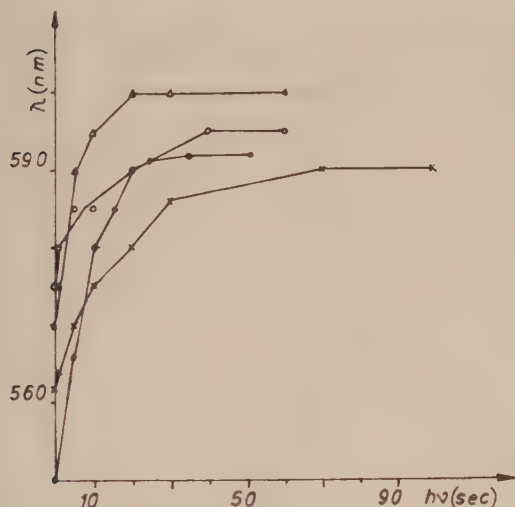


Abb. 10:

Abhängigkeit der E/Z-Reversion bei DHOEBV von Lösungsmittel und Belichtungsdauer: Verschiebung des Absorptionsmaximums während der Isomerisierung in:

"•": CHCl₃,

"x": Dioxan,

"o": MeOH,

"Δ": DMSO

Die E/Z- Rückreaktion bei DHOEBV verlief sehr ähnlich wie bei OEBV (Tabelle 3, Abb. 10).

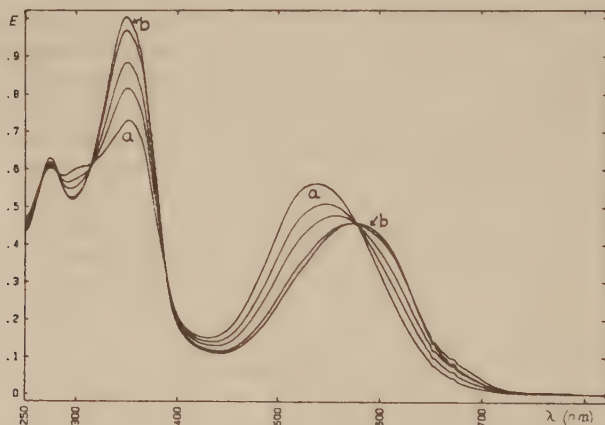
ZZE- DHOEBV zeigte, gelöst in CHCl₃, eine violette Färbung. Das Absorptionsmaximum lag bei 550nm, im Kurzwelligen existierte neben der Soretbande bei 352nm noch ein zusätzlicher scharfer Peak bei 280nm. Das Intensitätsverhältnis S₁ zu S₂ betrug 1 zu 1.6. Durch Belichtung verschob sich das Maximum binnen 15sec auf 585nm, wobei die Intensität der Bande deutlich (11.8%) zurückging. Bei weiterer Weißlichtbestrahlung stellte sich ein neues Maximum bei 592nm (ZZZ) ein, die Intensität stieg wieder geringfügig an, um zum Ende der Belichtung (ca. 30sec) erneut abzufallen (Abb. 11). Dieser Rückgang bedeutete jedoch ein irreversibles Ausbleichen (d.h. Zerstörung) des Chromophors. Die Soretbande veränderte ihre Lage während der Belichtung nicht, stieg jedoch deutlich an (24%). Die 280nm Absorption ändert weder Lage noch

Intensität. Die blaue Lösung des ZZZ- Isomers zeigte ein Extinktionsverhältnis S_1 zu S_2 von 1. zu 2.4.

Die chromatographische Kontrolle ergab reines ZZE- Isomer ($R_f=0.23$, $\text{CHCl}_3/2\% \text{ MeOH}$) vor und reines ZZZ- Isomer ($R_f=0.79$) nach der Belichtung.

Die Belichtung von ZZZ- DHOEBV zeigte deutlich, daß dieser Chromophor unter Luftsauerstoff sehr leicht angegriffen wurde. Im Gegensatz zu OEBV, begann er bereits nach kurzen Belichtungszeiten auszubleichen. Die Lage des Absorptionsmaximums veränderte sich jedoch dabei nicht (siehe auch B. 1.1.3.5).

Abb. 11: Rückisomerisierung von ZZE- DHOEBV in CHCl_3 mit Weißlicht: a) vor, b) nach 40sec $h\nu$



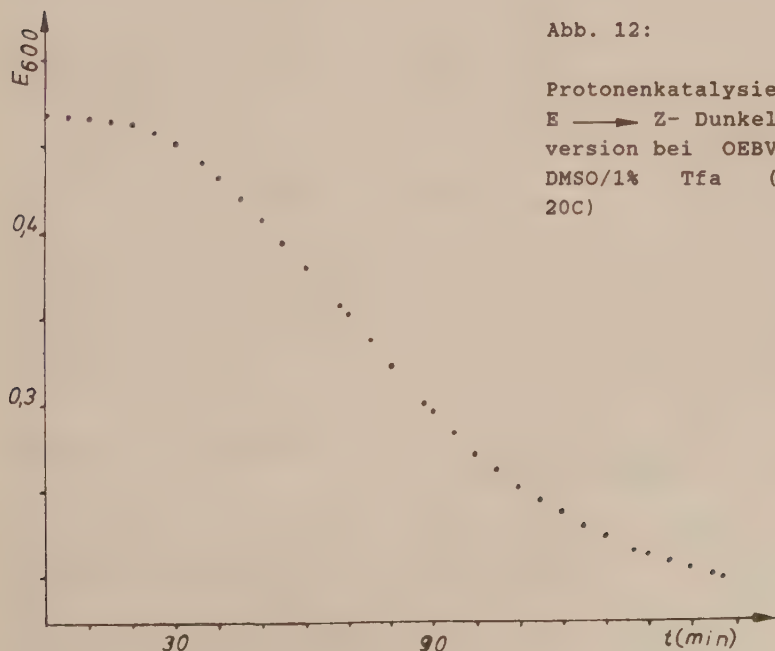
1.1.3.3 Säure-/Basen- katalysierte E/Z- (Photo-) Reversion

Das ZZE- Anion von (8) ist, wie alle (Dihydro-)Bilatriene, im DMSO/Wasser Milieu äußerst instabil (siehe B. 1.1.3.1). Das Kation hingegen kann bei $\text{pH}=2.1$ über eine Stunde ohne Rückisomerisation erhalten werden (FALK et al., 1984; KUFER et al., 1982). Trotzdem läuft in aprotischem DMSO die E/Z-Konversion protonenkatalysiert ab, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit, neben der H^+ -Konzentration, auch vom übrigen Reaktionsmilieu abhängt.

Wurde OEBV in DMSO mit schwachen Weißlichtintensitäten bestrahlt (Volpi, Belichtungsstufe I, siehe C. 1.5), so verlief die Rückisomerisation erheblich langsamer als unter den

gerade beschriebenen Bedingungen (siehe B. 1.1.3.2). Nach 3min betrug das chromatographisch ermittelte Z/E- Isomerenverhältnis 1:1. Durch Protonierung (1 Vol. % Tfa) wurde die Isomerisierung hingegen beschleunigt, sodaß ein Lichtimpuls von 10sec (gleiche Intensität wie bei neutraler Probe) eine quantitative Photoumwandlung auslöste (Abb. 6b,c). Das Dünnschichtchromatogramm zeigte nur einen Fleck, identisch zu unbehandeltem ZZZ- Isomer. Weitere Belichtung führte zu keiner weiteren Änderung der Absorptionsmaxima, die Chromophorlösung begann jedoch geringfügig auszubleichen.

Analog wurde die protonenkatalysierte Dunkelreversion (Abb. 12) von OEBV in DMSO/1% Tfa bei Raumtemperatur gemessen. Das Absorptionsmaximum des Isomerengemisches verschob sich innerhalb von drei Stunden deutlich längerwellig (Halbwertszeit 80min; t_0 : 614nm, $t_{1/20min}$: 648nm, 692nmSh, $t_{2/10min}$: 694nm, $t_{2/50min}$: 696nm). Gleichzeitig ging die Gesamtintensität der Bande leicht zurück (8%). Das Endprodukt der Reaktion war spektroskopisch und dünnschichtchromatographisch identisch zu (protoniertem) ZZZ- OEBV.



Die Instabilität des ZZE- Anions (siehe B. 1.1.3.1) machte seine chromatographische und spektroskopische Identifizierung mit den vorhandenen Mitteln unmöglich. Wurde E- OEBV in DMSO mit KOH versetzt, revertierte das entsprechende ZZE- Anion sofort zu ZZZ- (Abb. 6d). Das Absorptionsspektrum zeigte mit Weißlichtbestrahlung keine Änderungen der Maxima (Intensität stieg etwas an).

1.1.3.4 Abhängigkeit der E/Z- Reversion von der Temperatur

Untersuchungen von FALK et al. (1983b) über die thermische Stabilität von Bilatrienen und 2,3- Dihydrobilatrienen a,b,c ergeben gravierende Unterschiede für Diastereomere, die im Bereich der Doppelbindung des gesättigten bzw. ungesättigten Lactamringes isomerisiert wurden (4E/15E). Zwischen den Partialstrukturen Dihydropyrromethenon und Pyrromethenon konnte kein diesbezüglicher Unterschied festgestellt werden und sie verhielten sich zudem sehr ähnlich zu den vollständig ungesättigten Bilatrienen- a,b,c.

Die thermische Umwandlung von 4Z,10Z,15E- (7) in einem polaren Lösungsmittel (Toluol) verläuft eindeutig nach einem Reaktionsgeschwindigkeitsgesetz ersten Ordnung, und wird in Gegenwart von Protonen drastisch beschleunigt (quantitative E/Z- Reversion bei Raumtemperatur in 15min). Die Rückisomerisierung von 2,3- Dihydrobilatrienen ist gegenüber dem ungesättigten System durch Verringerung der Aktivierungsenergie begünstigt. Dies gilt besonders für 4E- Isomere (thermische E/Z- Umwandlung bei EZZ- (9) nicht mehr meßbar), ist jedoch auch für 15E- Isomere deutlich ausgeprägt. Die Aktivierungsenthalpie ist ebenfalls besonders für 4E- Verbindungen vermindert, die erhöhte Labilität von 15E- wird sowohl vom enthalpischen als auch vom entropischen Anteil verursacht (geringere Delokalisation der Ladungen im Übergangszustand; FALK et al., 1983b).

In der Folge wurde die thermische Stabilität von 15E- OEBV und 15E- DHOEBV näher untersucht.

Die Isomere blieben im festen Zustand (d.h. zur Trockene eingeeengt, nicht kristallisiert) im Dunklen bei minus 18°C lange Zeit (> sechs Monate) stabil (siehe B. 1.1.2). Auch bei Raumtemperatur trat nach mehreren Tagen Stehen an der Luft noch keine Änderung in der Pigmentzusammensetzung auf. In Lösung unterlagen die Isomeren (als freie Basen in Chlo-

roform) einer langsamen, stetigen E/Z- Isomerisierung (Halbwertszeit ca. 20 Tage bei 4 und 20C, Tabelle 4).

Das Absorptionsmaximum verschob sich dabei im Laufe der Tage langsam längerwellig, zugleich nahm die Intensität der S₁-Bande ab (14%/4C, 17%/20C). Das Dünnschichtchromatogramm wies wachsende ZZZ- Anteile, jedoch keine Abbauprodukte auf. ZZZ- OEBV in CHCl₃ zeigte während der gleichen Zeit (20C) eine leichte bathochrome Verschiebung (3nm) seiner Hauptabsorptionsbande bei gleichzeitigem langsamen Ausbleichen (Intensität ging um 24% zurück). Es entstanden jedoch ebenfalls keine spektroskopisch/chromatographisch sichtbaren Nebenprodukte.

Tabelle 4: Stabilität von ZZE- OEBV in Lösung (CHCl₃)

Zeit (Std.)	Absorption λ_{vis}/uv (nm)	Extinktion E_{vis}/uv	Q_{vis}/uv	Temp. (C)
0	604/367	0.175/0.5	0.35	4
22	604/367	0.174/0.5	0.348	
48	604/370	0.171/0.5	0.342	
168	610/370	0.150/0.45	0.33	
264	612/370	0.135/0.43	0.314	
0	604/367	0.267/0.79	0.338	20
24	611/370	0.260/0.78	0.33	
144	614/369	0.234/0.77	0.304	
240	620/370	0.213/0.73	0.292	

Bei kurzzeitiger Erwärmung blieben ZZE- Isomere relativ stabil:

Wurde ZZE- OEBV in CHCl₃ (dunkel) in einer verschlossenen Küvette (um das Volumen möglichst konstant zu halten) im Wasserbad inkubiert und nach dem Abkühlen ein Absorptionsspektrum gemessen, so zeigte es sich nach 10min bei 50C unverändert gegenüber der nicht erwärmten Probe. Erst eine einminütige Weißlichtbestrahlung nach dem Abkühlen auf RT führte zum entsprechenden ZZZ- Isomer. Ebenso hatten ZZE- OEBV und ZZE- DHOEBV nach fünf Minuten Rückflußkochen in CHCl₃ (dunkel, jedoch unter Luft) identische Spektren verglichen zur jeweiligen unbehandelten Referenz (minimale Intensitätssteigerungen auf Konzentrierung der Lösung durch Verdampfen des Lösungsmittels zurückzuführen).

Um Volumenänderungen während der thermische Reversion völlig auszuschließen, wurde die Hitzebehandlung von ZZE- OEBV über

zwei Stunden in DMSO durchgeführt.

Dabei wurde die E/Z- Umwandlung der Chromophore überlagert von spezifischen, temperaturabhängigen, Absorptionsänderungen. In einer Kinetik wurde die Verschiebung der Gesamtaborption sowie die Intensitätsabnahme im Maximum des ZZE- Isomers registriert (Tabelle 5).

Das Absorptionsmaximum von ZZE- OEBV in DMSO lag bei Raumtemperatur (23°C) bei 610nm und verschob sich bei langsamem Anwärmen (<70°C) zuerst hypsochrom auf 600nm, dann wieder bathochrom auf 608nm (≈80°C), Abb. 13b). Ließ man die Lösung zum Abkühlen dunkel stehen, lag das Maximum letztlich bei 634nm (30°C), nach weiteren 24 Stunden bei 638nm (20°C). Die Intensität der Gesamtaborption sank während dem Erhitzen kontinuierlich ab (Abb. 13a) und betrug nach dem Abkühlen auf 20°C noch 73% der Anfangsextinktion. Die Lage der S₂-Bande verschob sich dabei nur geringfügig (Tabelle 5), änderte jedoch stark ihre Intensität. Diese sank deutlich mit steigender Temperatur, lag nach dem Abkühlen aber wieder bei 96.5% der Ausgangsextinktion.

Tabelle 5: Temperaturabhängige E/Z- Konversion bei OEBV in DMSO

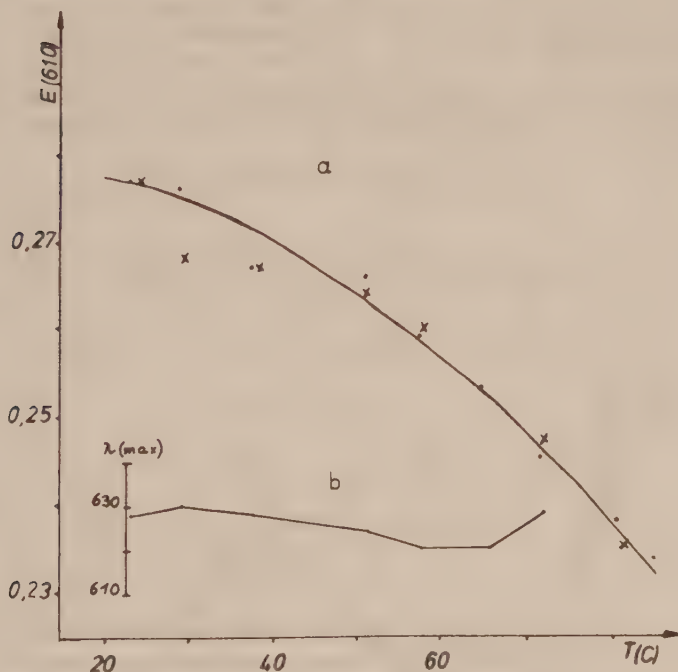
Zeit (min)	Temperatur ¹ (°C)	Absorption ¹ $\lambda_{vis. UV}$ (nm)	Extinktion $E_{vis. UV}$	$Q_{vis. UV}$
0	23.2	610/370	0.277/0.79	0.351
16	28.9	608/371	0.276/0.78	0.354
32	37.5	608/370	0.267/0.76	0.351
48	51.0	604/370	0.266/0.73	0.364
64	57.6	600/369	0.259/0.712	0.364
80	64.8	600/369	0.253/0.68	0.372
96	72.0	600/369	0.245/0.66	0.371
112	80.5	608/369	0.238/0.645	0.369
128	80.6	610/370	0.228/0.632	0.361
188	30.0	634/372	0.204/0.762	0.268
1500	20.5	638/371	0.165/0.65	0.254

1) Temperatur/Absorption, gemessen zu Beginn des Spektrums

Aus der Lage der Maxima bei unterschiedlichen Temperaturen ließ sich schließen, daß die E/Z- Reversion zum Teil abgelaufen war (reines ZZZ- Isomer: $\lambda_{max} = 674nm$), und außerdem, daß das ZZE- Isomere bei Temperaturerhöhung in einer etwas gestreckteren Konformation vorliegen mußte. Die chromatographische Analyse ergab ein Isomerenverhältnis ZZE:ZZZ von ca. 1:1.

Eine entsprechende Temperaturabhängigkeit der Absorption lag auch beim ZZZ- Chromophor vor. Bei Erwärmung auf 78°C verschob sich das Hauptmaximum um nahezu 15nm kürzerwellig, parallel dazu ging die Intensität um rund 10% zurück. Beim Abkühlen erhielt man ein Absorptionsmaximum bei 670nm, mit einer Schulter bei 640nm (Intensität blieb konstant!). Die Sorretbande verschob sich bei höheren Temperaturen von 372 auf 369nm, die Intensität ging um 15% zurück. Nach Erkalten der Probe waren Lage und Extinktion wieder identisch zur nicht temperierten Referenz.

Abb. 13: Partielle E/Z- Rückisomerisierung von ZZE- OEBV in DMSO durch Temperaturerhöhung: a) Abnahme der Extinktion, b) Verschiebung des Absorptionsmaximums in Abhängigkeit von der Temperatur



1.1.3.5 Photoreaktionen von Dihydrooktaethylbiliverdin und Oktaethylbiliverdin in Abhängigkeit von Lösungsmittel, Lichtqualität und anderer Faktoren

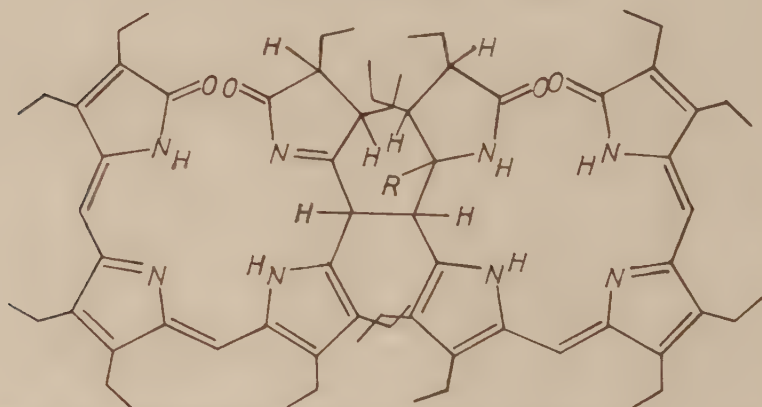
Die photochemische E/Z- Umwandlung (siehe B. 1.1.3.2 bis 1.1.3.4) war abhängig von Lichtqualität, Belichtungsdauer,

Lösungsmiteleinflüssen, Temperatur und Protonierungsgrad. Neben dieser Isomerisierung unterliegen die Tetrapyrrolchromophore jedoch auch zahlreichen anderen Reaktionen: Komplexbildung mit Metallen (Übersicht bei SCHEER, 1981), (Photo-)reduktionen (Rubine mit Natriumborhydrid: KUFER und SCHEER, 1979; Rubinoide: FALK et al., 1980) und vermehrt Photooxidationen (Purpurine, Violine, farblose Produkte; Übersicht bei KRAUSS, 1980).

DHOEBV besitzt dabei gegenüber OEBV durch seinen hydrierten Ring A erhöhte Reaktivität: In Gegenwart von Sauerstoff läßt es sich durch ausgedehnte Belichtung (≥ 60 min) mit Weißlicht (mit UV- Anteil) in einer Reihe von Lösungsmitteln (MeOH, CH_2Cl_2 , Benzol) oxidieren. Dabei entstehen neben dem ungesättigten OEBV drei Purpurine: zwei Tripyrrinone (Ring A abgespalten), sowie eine Dihydroverbindung mit zusätzlicher Hydroxylgruppe an C-4 und einer Ketofunktion an C-5.

Daneben finden sich auch anaerobe Photooxidationen, die zu Violinen (z.B. Monomere mit Estergruppen an C-4 und C-5, oder C-5- verbrückte Dimere wie 10) führen (KRAUSS, 1980).

(10) Violin 24 (KRAUSS, 1980)



Schon bei der Präparation von Photoisomeren fiel auf den Dünnschichtchromatogrammen die große Zahl von gelben (Rubine, Rubinoide oder Pyrromethenonfragmente), roten (Purpurine) und violetten (Violine) Nebenprodukten auf, die bei Reaktion in MeOH gehäuft gegenüber DMSO, sowie bei DHOEBV viel stärker als bei OEBV, auftraten (siehe B. 1.1.2).

Auch bei den Belichtungsexperimenten zur Bestimmung der E/Z-Reversion bzw. Bestrahlung zur Aufnahme von Fluoreszenz- (siehe B. 1.1.4) und ^1H -NMR- (siehe B. 1.1.5) Spektren tra-

ten Veränderungen auf, die auf Photooxidationen schließen ließen.

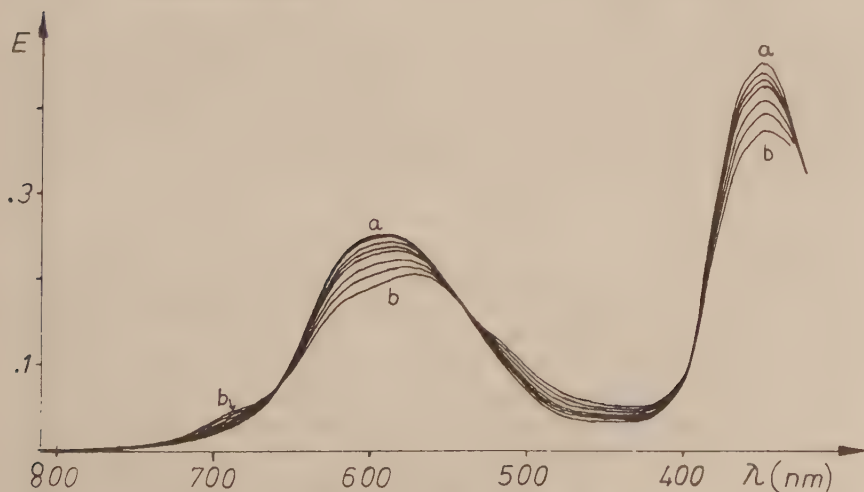
Als besonders wirksam erwies sich dabei Licht mit ultraviolettem Anteil auf OEBV/DHOEBV, gelöst in Chloroform. Daneben war aber auch eine Reihe anderer Faktoren von Bedeutung.

DHOEBV:

a) Wurde ZZZ- DHOEBV in CHCl_3 bei Raumtemperatur an der Luft 10min mit Weißlicht mit UV- Anteil (d.h. $\geq 350\text{nm}$, Belichtungseinrichtung im DMR, siehe C. 1.5) bestrahlt, so zeigte sich schon nach 10sec, und bei weiterer Belichtung immer stärker, eine Änderung im sichtbaren Wellenlängenbereich (Abb. 14). Das Absorptionsmaximum bei 592nm spaltete sich auf in eine Bande bei 570nm mit einer ausgeprägten Schulter um 620nm . Parallel zum Rückgang der Extinktion in diesem Bereich entstanden neue Schultern bei 690 und 520nm . Die Soretbande blieb in ihrer Lage unverändert, nur ihre Intensität nahm stark ab (18%).

Die chromatographische Überprüfung zeigte neben dem ZZZ- DHOEBV (NP, $\text{CCl}_4/\text{Aceton } 9:1$, $R_f=0.72$) eine polarere blaugrüne Verbindung bei $R_f=0.63$ (nach DC identisch zu OEBV; mögliche andere Produkte unterhalb der Nachweisgrenze).

Abb. 14: ZZZ- DHOEBV in CHCl_3 , bestrahlt mit Weißlicht ($\geq 350\text{nm}$, siehe C. 1.5): a) vor, b) nach 10min $h\nu$



Für diesen Abbau könnten folgende Ursachen, auch in Kombination, verantwortlich sein: Luftsauerstoff, UV- Strahlung, zu lange Belichtungsdauer, sowie der Lösungsmiteleinfluß.

b) Kürzere Belichtungszeiten (zwei bis drei Minuten) führten zu keiner Veränderung des Absorptionsspektrums von ZZZ-DHOEBV, wenn die Bestrahlung in Chloroform unter Luftsauerstoff mit Weißlicht ohne UV- Anteil (d.h. $\geq 400\text{nm}$, Leitz Projektor, siehe C. 1.5) durchgeführt wurde (siehe B. 1.1.3.2).

c) Wurde ZZZ- DHOEBV in CHCl_3 unter Argonatmosphäre 16 min mit Weißlicht (ohne UV- Anteil) bestrahlt, erhielt man spektroskopisch und chromatographisch dasselbe Resultat wie unter a) beschrieben.

d) Belichtete man das Pigment statt in Chloroform in Toluol (unter sonst gleichen Bedingungen: 9min Weißlicht mit UV- Anteil, Luftsauerstoff), so verschob sich das Maximum von ZZZ- DHOEBV von 586 auf 577nm, zusätzlich trat im Bereich von 510nm eine neue Schulter hervor. Im Gegensatz zu CHCl_3 entstand aber kein längerwellig absorbierendes Produkt. Die S_2 - Bande ging wiederum in der Extinktion stark zurück, ohne jedoch ihre Lage zu verändern. Im Chromatogramm zeigte sich nur das Ausgangsprodukt (mögliche andere Produkte unterhalb der Nachweisgrenze).

e) Wurde ZZZ- DHOEBV in Toluol unter Argonatmosphäre 20min mit Weißlicht (ohne UV- Anteil) bestrahlt, ergab sich dasselbe Resultat wie bei d).

Das Ergebnis zeigte, daß Dihydrooktaethylbiliverdin (6) in Chloroform (mehr als in Toluol) einer Photoxidation unterlag, die bei steigenden Belichtungszeiten immer deutlicher hervortrat. Sie fand sowohl aerob als auch unter partiell anaeroben Bedingungen (reduzierter Sauerstoffpartialdruck durch Einleitung von Ar bzw. N_2) statt.

OEBV:

Die Belichtung von ZZE- und ZZZ- OEBV in CDCl_3 (Weißlicht mit UV- Anteil, siehe B. 1.1.5) ergab, in Abweichung von den normalen Absorptionsbanden (CHCl_3 : 650, 370nm), im langwelligen Bereich ein Doppelmaximum bei 670nm mit einer ausgeprägten Schulter bei 720nm. Durch Zugabe von Wasser veränderte sich das Intensitätsverhältnis der beiden Banden (Doppelpeak, 1:1). Dieses Phänomen gab unter anderem Anlaß zur Diskussion über mögliche Zwischen-/ Folgeprodukte bei der E/Z- Photokonversion (siehe B. 1.4), sowie zur Abklärung der möglichen (Oxidations-) Photo- Reaktionen in Zusammenhang mit Lösungsmittel und UV- Licht.

a) Die kurzzeitige (drei bis vier Minuten) Belichtung von ZZZ- und ZZE- Isomeren mit Weißlicht ohne UV- Anteil unter gleichzeitiger Einwirkung von Luftsauerstoff ergab immer nur ein dem ZZZ- OEBV identisches Produkt, ohne spektroskopische/chromatographische Anzeichen für die Bildung von Oxidationsprodukten (siehe B. 1.1.3.2).

Auch bei längeren Belichtungszeiten (≤ 15 min, Weißlicht ohne UV- Anteil, CHCl_3 über Al_2O_3 gereinigt, Argonatmosphäre) wurde das Absorptionsspektrum von ZZZ- OEBV in der Lage der Banden nicht, und in der Intensität nur minimal verändert (leichtes Ausbleichen). Wurde die belichtete Lösung mit H_2O gesättigt (Chloroformphase mit einem Tropfen Wasser überschichtet), blieb das Spektrum unverändert; Protonierung mit Tfa führte zum normalen Kationenspektrum (siehe Tabelle 2). Fortgesetzte Einstrahlung (≥ 30 min) resultierte im Entstehen einer leichten langwelligen Schulter um 730nm ohne Verschiebung des Hauptmaximums, die Intensität ging auch hierbei um nicht mehr als 5% zurück.

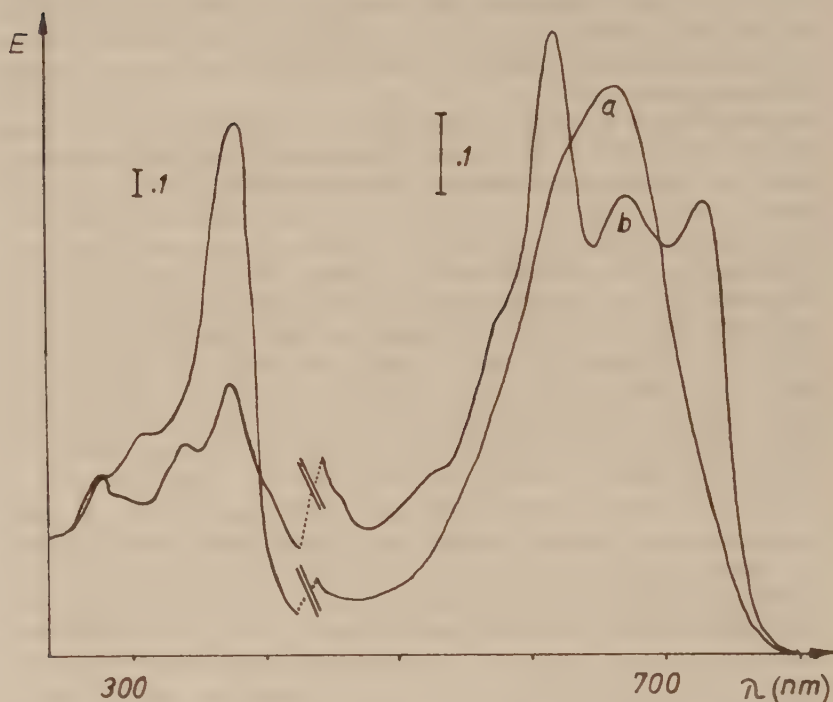
b) Belichtete man ZZZ- OEBV in gereinigtem CHCl_3 in einer verschlossenen Küvette (Lösung mit Argon gesättigt) im Photoreaktor (siehe C. 1.5) mit harter UV- Strahlung (2537Å), so erhielt man schon nach fünf Sekunden ein völlig verändertes Spektrum mit Absorptionsmaxima bei 720, 662 und 607nm, sowie deutlichen Schultern um 560, 520 und 420nm. Die UV- Bande erschien ebenfalls deutlich aufgespalten, zudem änderte sich die Intensität drastisch (Abb. 15). Wurde diese Lösung mit H_2O überschichtet, änderte sich das Extinktionsverhältnis der langwelligen Banden ($E_{607}:E_{662}:E_{720}$ gleich 1.4:1:1 resp. 1.16:1:1.06 nach H_2O - Zugabe) deutlich, ohne jedoch die Maxima zu verschieben.

Das Chromatogramm zeigte statt des reinen ZZZ- OEBV's (NP, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 19:1, $R_f=0.83$) rote ($R_f=0.57$), blaue ($R_f=0.52$) und violette ($R_f=0$) Abbauprodukte.

Längere Bestrahlungszeiten ($\geq$ zwei Minuten) ergaben völlig farblose Lösungen ($\lambda_{\text{max}}=294\text{nm}$).

Die Belichtung einer OEBV- Lösung unter analogen Bedingungen mit UV- Strahlung von 3500Å erforderte längere Intervalle (≥ 16 min, leichte Erwärmung der Probe), führten aber letztlich zum selben spektroskopischen/chromatographischen Resultat wie mit harter UV-Strahlung (5sec).

Abb. 15: Belichtung von ZZZ- OEBV in CHCl_3 mit UV- Licht:
a) vor, b) nach 5sec $h\nu$ (2537Å)



c) Wurde ZZZ- OEBV in saurem Chloroform (2ml CHCl_3 mit zwei Tropfen HCl versetzen) unter Argonatmosphäre (≤ 15 min) mit Weißlicht (ohne UV- Anteil) bestrahlt, so veränderte sich das Kationenspektrum nicht (siehe Tabelle 2), bleichte aber geringfügig aus (4%, siehe B. 1.1.3.3). Die analytische DC ergab reines OEBV ohne Abbauprodukte.

d) Die Belichtung von Kationen in CHCl_3 (verschlossene Küvette, aber unter Luftsauerstoff) mit 350nm UV- Strahlung führte wieder zum oxidativen Abbau von Pigment. Das Kation mit HCl verschob sein Maximum binnen 10min von 694nm etwas kürzerwelliger, daneben entstand eine ausgeprägte Schulter bei 614nm neu (Abb. 16). Die Intensitäten von Haupt- und (unverschobener) UV- Bande gingen drastisch (30 bzw. 15%) zurück.

Die chromatographische Kontrolle zeigte neben OEBV (NP, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 49:1, $R_f=0.82$) ein unpolareres violettes ($R_f=0.9$) ein polareres rotes ($R_f=0.74$), sowie zwei (mengenmäßig

geringer vorliegende) blaugrüne Produkte bei $R_f=0.3$ und 0.25 an.

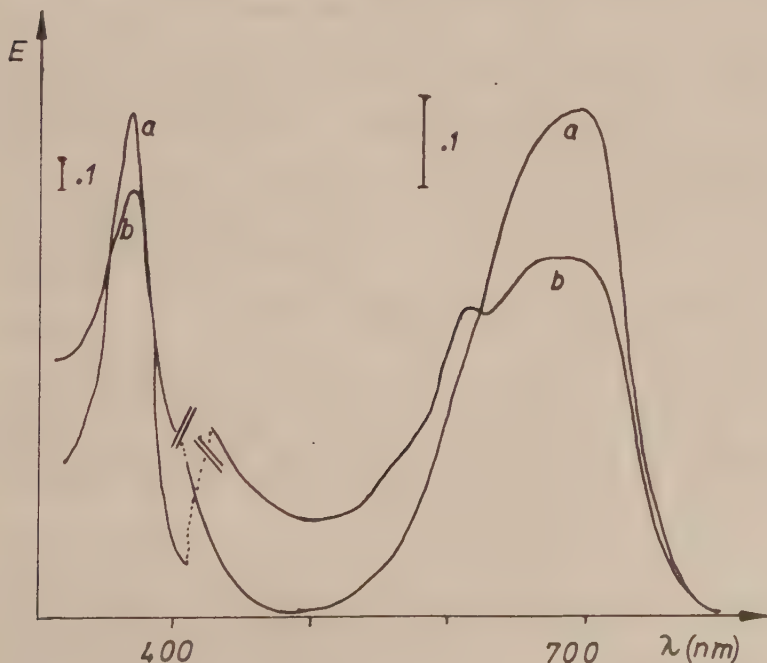
Das Kation mit Tfa wies nach 11min Bestrahlung ein unver-
schobenes, aber in der Intensität um 12% verringertes Haupt-
maximum auf (siehe Tabelle 2), sowie zusätzlich noch eine
leichte Schulter im Bereich von 550nm.

Der chromatographische Vergleich zum HCl- Kation ergab fol-
gende Produktverteilung: violett ($R_f=0.98$), violett (0.9),
ZZZ- OEBV (0.82), rot (0.74), rot (0.49), violett (0.2),
grün (0.05).

Auch mit Eisessig nur partiell protoniertes OEBV wies nach
9min UV- Licht deutliche spektrale Veränderungen auf. Neben
dem Hauptmaximum bei 659nm entstanden Schultern bei 710,
610, 570 und 520nm. Parallel dazu wurde die Extinktion der
Hauptabsorptionsbande um 30% verringert.

Das Chromatogramm zeigte neben OEBV polarere gelbe ($R_f=$
 0.77), rote (0.38) und blaugrüne (0.25) Abbauprodukte.

Abb. 16: Belichtung von ZZZ- OEBV' in CHCl_3/HCl mit UV-Licht
a) vor, b) nach 10min $h\nu$ ($3500\text{\AA}$)



Die Ergebnisse der Versuche a) bis d) zeigten, daß die Belichtung von OEBV in Chloroform Abbaureaktionen einleitete, die verschiedene, vor allem von der Lichtqualität (UV-Strahlung), der Belichtungsdauer und dem Grad der Protonierung abhängige, (Oxidations-) Produkte liefert. Zwischen Luft und Argonatmosphäre konnte kein entscheidender Unterschied festgestellt werden.

CHCl_3 stellt ein sehr labiles Solvens dar, welches an der Luft lichtinduziert (UV- Anteil im Tageslicht!) Phosgen bilden kann. Dieses zersetzt sich mit Wasser weiter zu CO_2 und HCl . Um die Bildung von Phosgen zu verhindern, werden dem Lösungsmittel Stabilisatoren (z.B. 0.2% Ethanol) zugesetzt und direkte Lichteinwirkung (braune Flaschen) vermieden.

Ein entsprechender Versuch mit CHCl_3 , welches, von Stabilisatoren befreit (über Al_2O_3 geben), längere Zeit Luft und Licht ausgesetzt war bewies, daß OEBV bereits ohne zusätzliche Belichtung beim Lösen abgebaut wurde. Es entstand ein spektroskopisch und chromatographisch identisches Muster wie bei b) mit UV- Bestrahlung.

(Die Abbauprodukte der Photooxidationen in CHCl_3 wurden nicht weiter isoliert oder charakterisiert.)

Die nicht erklärbaren Signalverschiebungen bei der Belichtung der $^1\text{H-NMR}$ - Proben (siehe B. 1.1.5) könnten ihre Ursache in vergleichbaren Reaktionen, hervorgerufen durch UV-Einwirkung auf CDCl_3 , haben.

Entsprechende Versuche mit OEBV, gelöst in Benzol, ergaben sowohl bei Weißlichtbestrahlung (ohne UV- Anteil, 30min unter Argonatmosphäre), als auch bei UV- Strahlung (3500Å, 30 min, Lösung mit Ar gesättigt) keinerlei spektrale Änderungen oder chromatographisch nachweisbare Abbauprodukte.

Belichtete man das Kation in Benzol (mit Tfa, siehe Tabelle 2) mit UV-Licht (3500Å, 40min), so ging die Extinktion der langwelligen Bande sehr stark zurück (33%), das Hauptmaximum verschob sich 6nm hypsochrom und es entstand eine kleine Schulter im Bereich von 550nm. Das Chromatogramm (NP, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 49:1) wies neben OEBV auf eine geringe Menge einer gelben Verbindung ($R_f=0.74$) hin.

Benzol unterliegt keiner dem CHCl_3 vergleichbaren Photolyse, der Chromophor blieb auch durch Belichtung mit UV- Licht stabil. Erst die Bestrahlung des Kations führte zu leichten Oxidationsschäden.

1.1.3.6 Reaktion von Dihydroooktaethylbiliverdin mit Salzsäure

Da die FT-IR Messungen an mit Tfa angesäuerten OEBV/DHOEBV-Isomeren (siehe B. 1.3) uneinheitliche Resultate erbrachten, wurde versucht, das Kation durch Einleiten von HCl- Gas (erzeugt aus NaCl durch Zutropfen von H_2SO_4) in eine DHOEBV/Etherlösung zu erzeugen.

Mit beginnender Gaseinleitung trat sofort eine deutliche Farbaufhellung der Pigmentlösung ein. Das Spektrum veränderte sich stark (siehe Tabelle 6), Hauptmaximum und Soretbande wurden zweigipflig. Zugleich wurde die Extinktion im Sichtbaren erhöht (Protonierung des entstehenden Produkts) und im UV verringert. Beim Wechsel des Lösungsmittels auf CH_2Cl_2 zeigte das entstandene Produkt ein Hauptmaximum bei 600nm mit deutlichen lang-/kurzwelligigen Schultern (nicht identisch zum zweigipfligen Spektrum der freien Base in CH_2Cl_2 , oder dem Kation mit HCl im selben Lösungsmittel, siehe Tabelle 2).

Der chromatographische Vergleich ergab, daß nur ein violettes Produkt, deutlich polarer als DHOEBV, entstanden war. Das Folgeprodukt konnte nicht näher charakterisiert werden. Es könnte sich dabei entweder um ein Violin - anaerobe Photooxidation von DHOEBV unter sauren Bedingungen in Methanol liefert drei Violine (KRAUSS, 1980) - möglicherweise dimer, vergleichbar (10), oder um ein chloriertes Produkt (ev. an C-5?) handeln. Das Violin (10) zeigt zwar spektrale Ähnlichkeiten (MeOH: 578, 535Sh, 328), erklärt aber nicht die langwelligeren Schultern (auch nicht als Kation) und ist zudem viel unpolarer als DHOEBV.

Tabelle 6: Reaktion von DHOEBV in Ether mit gasförmigem HCl

Produkt (Lösungsmittel)	Absorption(Extinktion) (nm)	Q_{vis} / UV
(6), freie Base (Ether)	592(0.535) 340(1.217), 276	0.44
Chlorierungsprodukt Kation (Ether)	710Sh, 692(0.81), 606(0.87), 550Sh 382(1.112), 334(1.02)	0.73 ¹ 0.85 ²
nach Neutralisation (CH_2Cl_2)	710Sh, 666, 600(0.983), 562Sh 306Sh, 330(0.943)	1.02

1) E_{692} / E_{382} 2) E_{606} / E_{334}

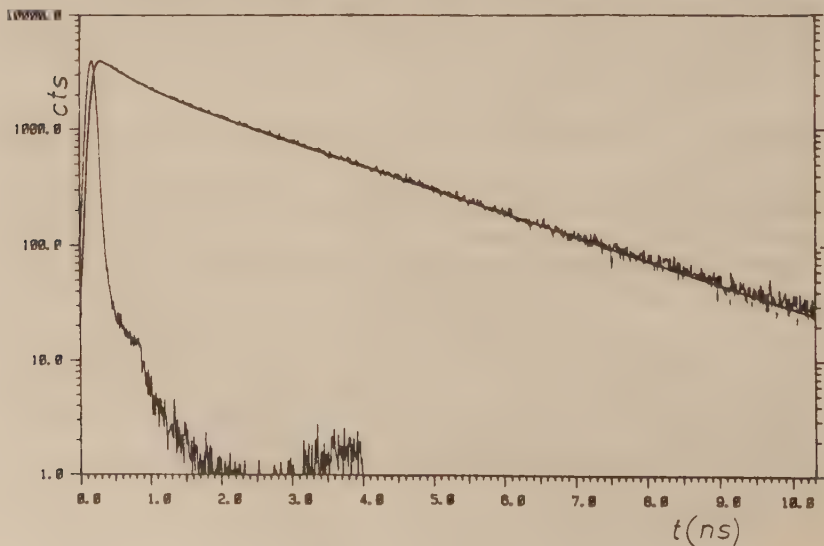
Das entstandene Produkt war relativ instabil; es zeigte spektrale Änderungen beim Stehen (dunkel) an der Luft, sowie Rückgang der 666nm Bande und Neubildung einer Schulter bei 511nm unter Weißlichtbestrahlung.

Zum Vergleich wurde ein Parallelversuch mit DHOEBV, welches in neutralem Ether gelöst und mit saurem Ether (HCl- Gas in absoluten Ether einleiten) titriert wurde, durchgeführt. Das Maximum (592nm) verschob sich längerwellig und wurde zweigipflig (627, 674nm), die S_2 -Bande verschob sich von 342 auf 349nm und bildete bei 333nm eine Schulter aus. Hierbei handelte es sich jedoch eindeutig um das Kationenspektrum von DHOEBV (siehe B. 1.1.3.1). Nach Abzug des Ether/Säure-Gemisches und Überführung in ein neutrales Lösungsmittel erhielt man erneut die freie Base des Verdins.

1.1.4 Fluoreszenzmessungen an Modellchromophoren

Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen an ZZE- OEBV (HOLZWARTH, 1984) in MeOH/5% HCl erbrachten bei Anregung mit 580nm Laserlicht Abklingkurven (Abb. 17), die (bei einer Emissionswellenlänge von 725nm) aus einer langlebigen (2099ps) und einer kurzlebigen (450ps) Zerfallskomponente zusammengesetzt waren. Kontrollversuche mit reinem ZZZ- Isomer ergaben je-

Abb. 17: Zeitaufgelöste Fluoreszenz- Abklingdauer bei der Anregung von ZZE- OEBV in MeOH/5% HCl



doch identische Kinetiken. Dies ließ vermuten, daß die Fluoreszenz, die beim ZZE- Isomer gemessen wurde, höchstwahrscheinlich auf "Verunreinigungen" von ZZZ- OEBV zurückgeführt werden muß, welches während der Messung durch E/Z- Rückisomerisation entstanden war. Über die Fluoreszenzabklingdauern von reinem ZZE existieren deshalb bisher keine Aussagen.

Fluoreszenz- Anregungsspektren von DHOEBV wurden durchwegs in CHCl_3 gemessen. Wurde im UV- Bereich angeregt (und vor allem bei längerer Messung an derselben Probe), ergab eine anschließende spektroskopische/chromatographische Überprüfung, daß ein Großteil der Chromophore durch Photo- (oxidations) Reaktionen abgebaut worden war. Die Aufnahme von reinen ZZE- Spektren wurde durch die hohe Intensität des Meßstrahls verhindert, der bereits eine fast vollständige Rückisomerisierung bewirkte.

Eine Messung von ZZZ- DHOEBV im Bereich von 300 bis 630nm (Tabelle 7) ergab Hauptemissionsbanden bei $\approx 595\text{nm}$ und $\approx 640\text{nm}$ für die Anregung im UV- Bereich und eine zusätzliche Hauptbande bei $\approx 540\text{nm}$ für die Anregung im 500nm- Bereich.

Tabelle 7: Ergebnisse der Fluoreszenzanregung von ZZZ- DHOEBV

Anregung (nm)	Emission (nm)
313	599, 626, 646, 705Sh, 753Sh
325	597, 638Sh, 648, 694Sh
346	595, 643, 695Sh
397	463, 532Sh, 595, 649, 698Sh
426	483, 525Sh, 593, 638, 695Sh
453	493, 537, 590, 642, 692Sh
469	544, 591, 641, 692Sh
483	540, 593, 639, 692Sh
493	535, 593, 640, 691Sh
518	530, 594, 638, 691Sh
539	593, 639, 692Sh
584	594, 638, 692Sh
631	637, 691Sh

1.1.5 ^1H - Kernresonanzspektroskopie an Konfigurationsisomeren

DHOEBV:

Das NMR- Spektrum (siehe C. 1.4) der ZZE- Isomere in CDCl_3 ergab folgende Signallagen für die Methin- Protonen: H-5

(5.38ppm), H-10 (6.98ppm), H-15 (6.23ppm), (Abb. 18a). Diese Ergebnisse stimmten sehr genau mit früheren Messungen von KUFER et al. (1982) an protonierten Chromophoren überein (5.38, 6.93, 6.16ppm).

Zugleich zeigte sich aber, daß immer ein ZZZ- Anteil in der ZZE- Ausgangslösung vorhanden war (partielle Reversion durch Intensität des Meßstrahls oder Meßtemperatur/30C). Durch Belichtung mit Weißlicht (UV- Anteil, 2min) erhielt man das Spektrum von nahezu reinem ZZZ (Abb. 18b): H-5 (5.45ppm), H-10 (6.57ppm), H-15 (5.99ppm); zum Vergleich KUFER et al. (1982): 5.38, 6.93, 5.97ppm. Die Verschiebung des ZZE- 15H- Signals um 0.24ppm zu niedrigem Feld ist typisch für Methinprotonen an der Isomerisationsposition (GOSSAUER et al., 1981; FALK und SCHLEDERER, 1978).

Nicht erklärt werden konnte die Tieffeldverschiebung des 10H- Methinsignals von nahezu 0.4ppmin ZZE- gegenüber ZZZ (Abb. 18a, b), da an dieser Position eigentlich keine Strukturänderung erwartet wurde (KUFER et al., 1982; THOMMLER, 1984). Die Lage des Methinprotons war jedoch identisch zum gereinigten ZZZ-Isomer aus der Z/E- Photoisomerisierung (Abb. 19a).

Wurde die belichtete ZZE- Lösung länger bestrahlt (Abb. 18c, d), konnte eine erneute Verschiebung des 10H- Methinsignals zu niedrigerem Feld (6.89ppm) beobachtet werden. Die Positionen von H-5 und H-15 änderten sich nicht. Dieser Zustand blieb stabil und konnte auch nach 24 Stunden (kühl stehen) erneut gemessen werden (Abb. 18e).

Als interessant erwies sich jedoch die Belichtung des ZZZ- Isomers. Auch hier verschob sich nämlich die 10H- Resonanz deutlich, um mehr als 0.3ppm, zu tieferem Feld (Abb. 19b.c), während die Signale für H-5 und H-15 nur unwesentlich verändert wurden. Das entstandene Produkt (nach 7min Belichtung, Weißlicht mit UV- Anteil) war über mehrere Tage stabil (Abb. 19d). Mit steigenden Belichtungszeiten bildeten sich auch bei sehr tiefem Feld (10 bis 14ppm) breite Signale aus. Durch Sättigung der in CDCl_3 gelösten und belichteten Proben mit D_2O konnten diese Signale (sowohl bei ZZE, als auch bei ZZZ) entfernt und zugleich die ursprüngliche 10H- Resonanz bei 6.57ppm wiederhergestellt werden (Abb. 19e).

Die Erklärung der Verschiebung der 10H- Resonanzen bei längerer Belichtung von ZZZ- und ZZE- DHOEBV, die dabei neu entstehenden Tieffeldsignale, sowie die Rekonstitution von

Abb. 18: Verschiebung der Methinprotonensignale bei Belichtung von ZZE- DHOEBV in CDCl_3 : a) vor, b) nach 2min, c) 4min, d) 6min Belichtung, e) nach 24 Stunden Stehen kühl und dunkel

E: ZZE-, Z: ZZZ- DHOEBV, F: "Folgeprodukt"

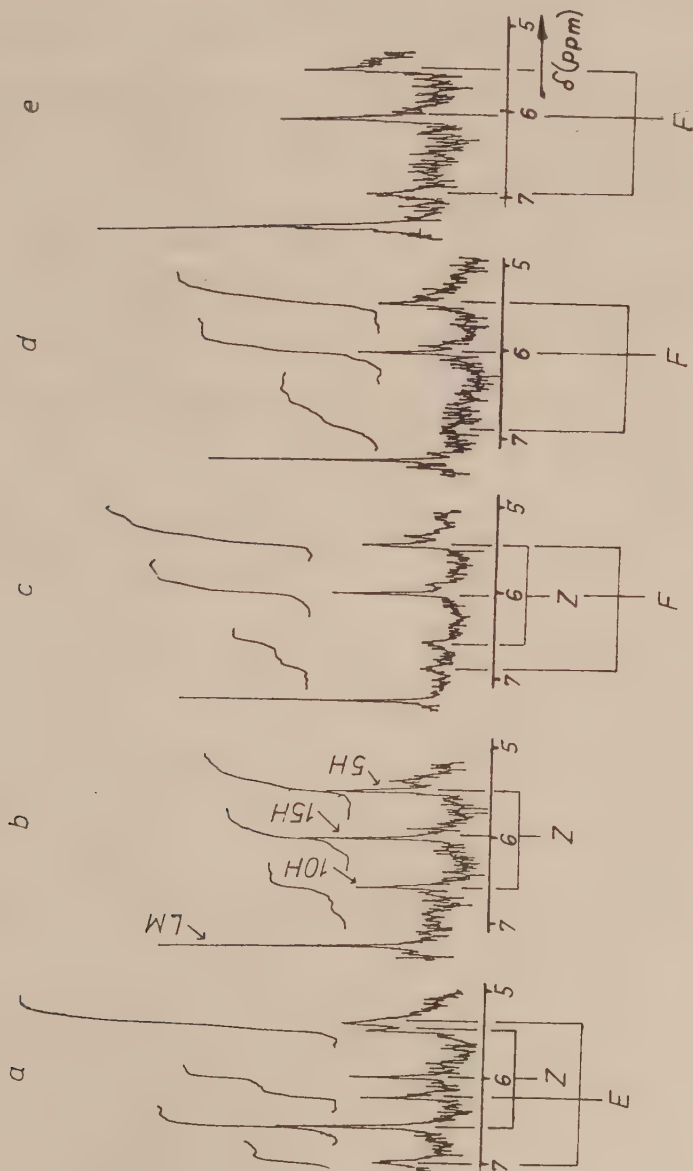
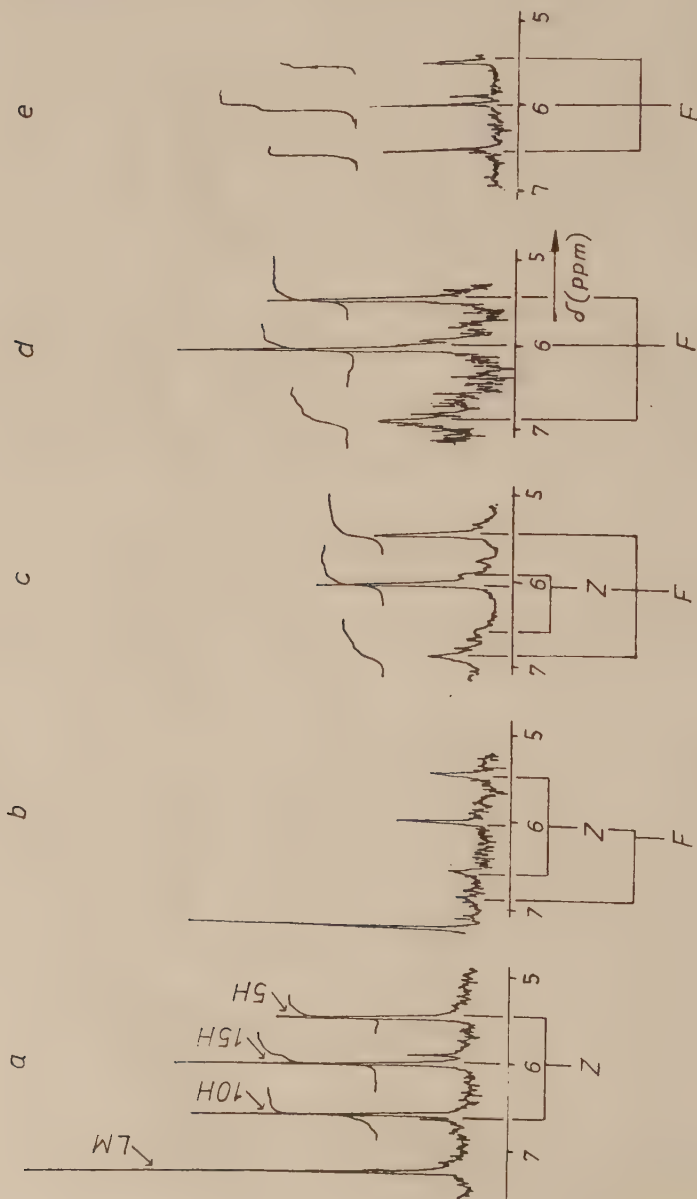


Abb. 19: Verschiebung der Methinprotonensignale bei Belichtung von ZZZ-DHOEBV in CDCl_3 : a) vor, b) nach 5min, c) 7min Belichtung, d) nach 24 Stunden Stehen kühl und dunkel, e) belichtete Probe mit D_2O versetzt



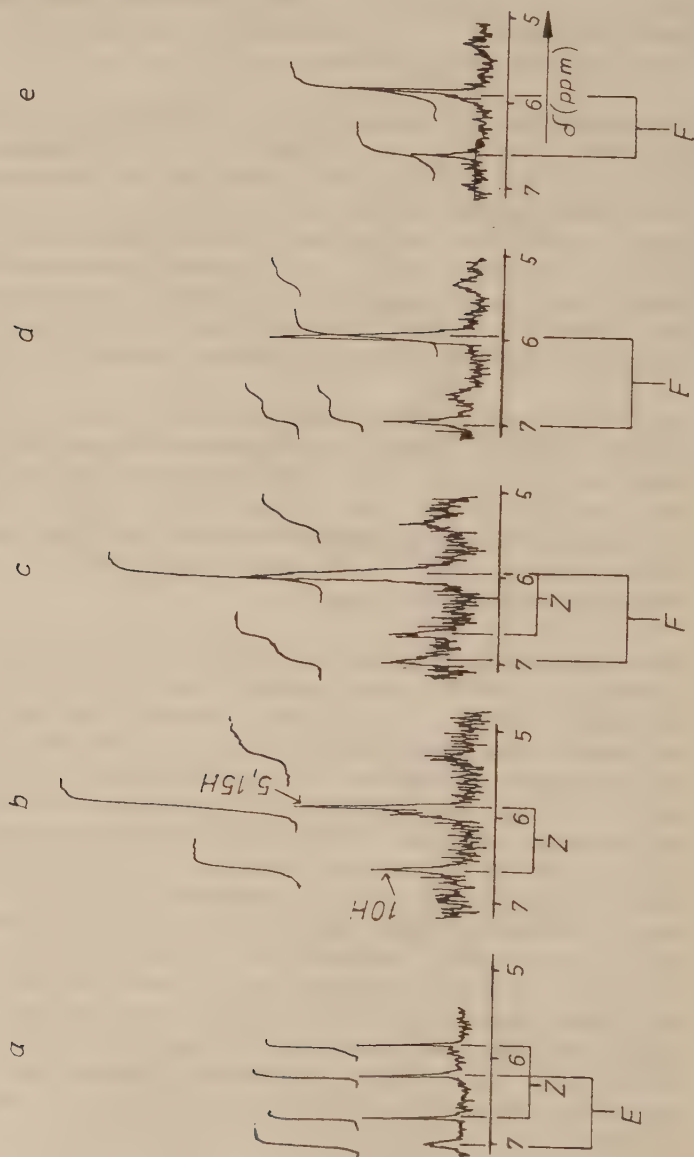
ZZZ nach D_2O - Zugabe könnte in der Entstehung eines neuen Isomerentyps während der Belichtung zu suchen sein (CMIEL, (1985). Dieses "ZEZ"- Isomere würde durch Belichtung von ZZZ entstehen, und durch intramolekulare Wasserstoff- Brücken im wasserfreien Lösungsmittel (möglicherweise durch Dimerisierung) stabilisiert. In wasserfreiem Lösungsmittel müßte es zudem, auch am Licht, relativ stabil bleiben.

In konzentrierten Lösungen ist ein ähnliches Phänomen bei Biliverdin IX α - dme (12, siehe B. 1.2.1.2) bekannt. Dabei bilden sich kurzlebige ($\approx ms$) Dimere aus gestreckten 10 anti-E- Isomeren (BRASLAVSKY et al., 1983). Photoisomere dieses Typs sollten aber aus energetischen Gründen sehr labil sein (FALK und MÖLLER, 1983d) und wurden bisher noch nie isoliert, oder ihre Existenz mit direkten Methoden nachgewiesen. Ebenso wurde nie ein Zwischen- oder Folgeprodukt im Rahmen der Photoumwandlungen gefunden (siehe B. 1.4.).

Eine Protonierung des Chromophors durch "saures Chloroform" könnte ebenfalls für die Tieffeldverschiebung des 10H- Signals verantwortlich sein. Jedoch bedingt der Übergang von $CDCl_3$ zu d^1 -Tfa bei ZZZ- DHOEBV eine Tieffeldverschiebung des 10H- Signals um 0.9ppm und zugleich der 15H- Resonanz um 0.7ppm (KRAUSS, 1980). Letztere blieb jedoch bei Belichtung des ZZZ- Isomers unverändert.

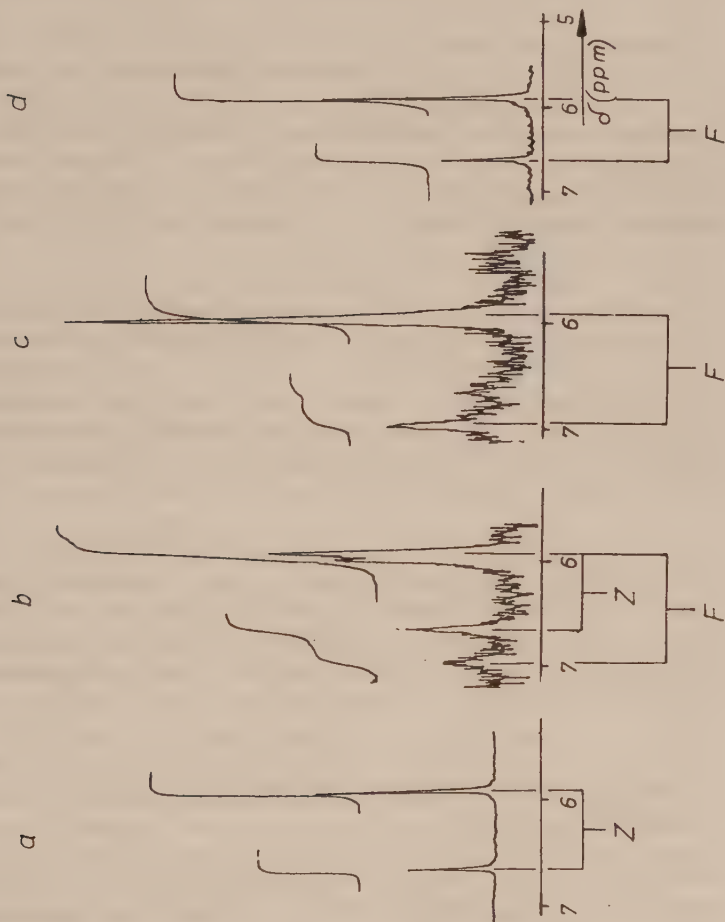
Spektroskopische und chromatographische Untersuchungen der vermessenen 1H -NMR Proben zeigten deutliche Unterschiede zu "normalem" DHOEBV: starke Verschiebungen bzw. Aufspaltungen der Absorptionsbanden, sowie Spuren von OEBV bzw. gelber und roter Produkte auf der DC. Da die Messungen in $CDCl_3$ durchgeführt wurden und als Lichtquelle eine ungefilterte 150W Halogenlampe verwendet wurde, bestand durchaus die Möglichkeit von UV- Reaktionen des Chloroforms und daraus resultierende Photooxidationen des Chromophors (siehe B. 1.1.3.5). Bei vollständigem Abbau der Chromophore zu Purpurinen/Violinen sollte die 5H- Resonanz des Verdins völlig verschwinden ($5-CH_2$ - : hochfeldverschoben $\approx 3.5-4.5ppm$, KRAUSS, 1980). Es war jedoch weder eine Signalverschiebung noch eine Verkleinerung des Integrals (Abb. 19) zu beobachten, obwohl man davon ausgehen mußte, daß während der Messung mehr als die Hälfte des DHOEBV's abgebaut wurde (Nachweis durch analytische DC).

Abb. 20: Verschiebung der Methinprotonensignale bei Belichtung von ZZE- OEBV in CDCl_3 : a) vor, b) nach 2min, c) 3min, d) 5min Belichtung, e) belichtete Probe mit D_2O versetzt



E: ZZE-, Z: ZZZ- OEBV, F: "Folgeprodukt"

Abb. 21: Verschiebung der Methinprotonensignale bei Belichtung von ZZZ- OEBV in CDCl_3 : a) vor, b) nach 3min, c) 7min Belichtung, d) belichtete Probe mit D_2O versetzt



OEBV:

Analoge Beobachtungen zu DHOEBV wurden auch am ungesättigten OEBV gemacht (Abb. 20, 21).

In diesem Fall lagen die Resonanzen des ZZZ- Isomers für H-5 und H-15 an derselben Position bei 5.90ppm, für das Methinproton an C-10 bei 6.64ppm (Abb. 21a). Das Spektrum für das

ZZE- Isomer wies erneut auf eine partielle Rückisomerisation hin. Neben dem Signal für das ZZZ- H-5/15 bei 5.84ppm. lag die entsprechende Resonanz für das ZZE- Isomere tieffeldverschoben bei 6.2ppm. Ebenso war das Signal des 10H- Methinprotons um 0.3ppm zu tieferem Feld verschoben (Abb. 20a).

2min Weißlicht reichten aus, um reines ZZZ- OEBV entstehen zu lassen (Abb. 20b, 21a). Weitere Belichtung des Isomeren führte, ebenso wie bei Bestrahlung des eigentlichen ZZZ- Isomers, zur erneuten Tieffeldverschiebung der 10H- Resonanz um rund 0.3ppm (Abb. 20c, d, Abb. 21b, c). Ebenso wie bei DHOEBV konnte durch Sättigen der CDCl_3 Phase mit D_2O der Zustand des ursprünglichen ZZZ- Chromophors wiederhergestellt werden (Abb. 20e, 21d).

Zur Erklärung können dieselben Gründe wie für DHOEBV geltend gemacht werden. Es kann immerhin auch die Möglichkeit bestehen bleiben (siehe Schema 7c), daß die Photoisomerisation über das Mercaptoethanolprodukt konformative Änderungen des Chromophors nach sich zieht. Das entstehende Zwischenprodukt Z^* würde dann erst durch Belichtung in das ZZZ- Isomer umgewandelt werden (Wasserstoffbrücken!, siehe B. 1.4).

Anzumerken ist aber auch, daß Signalverschiebungen der 10H- Methinprotonen bei Belichtung des ZZZ- Chromophors unterblieben, wenn die Messungen in Benzol durchgeführt wurden. Das machte wiederum Photooxidationen (bzw. auch andere Photoreaktionen) als Grund für die Änderungen wahrscheinlich (siehe B. 1.1.3.5).

1.2 Photoreaktionen an cyclisch helicalen und gestreckten Biliverdinen

Neben den synthetischen Tetrapyrrolchromophoren OEBV und DHOEBV können auch die zum Teil in der Natur vorkommenden Biliverdine (siehe A. 1) als Modellsubstanzen für die Phycocyanin- und Phytochromchromophore (3a, b) herangezogen werden. Dabei sind vor allem die gestreckten Phorco- und Iso-phorcabiline von Interesse, da sie ähnliche Konformationen wie die Chromophore im nativen PC/Phytochrom besitzen. Ihre Reaktionen mit Licht könnten, im Vergleich zu den linearen Chromophoren im nativen Protein, zur Klärung von Fragen nach Konfigurationsänderungen im Photocycus P_r/P_{fr} dienen.

1.2.1 Biliverdin IX α und sein Dimethylester

1.2.1.1 Darstellung der Ausgangsprodukte

Biliverdin IX α (11a) wurde aus Bilirubin IX α (2) durch Oxidation mit DDQ in neutralem DMSO (siehe C 2.1.3) dargestellt (STOLL und GRAY, 1977; KUFER, 1977). Unter diesen milden Bedingungen wird als Hauptprodukt nur das IX α - Isomere gebildet. Bei anderen möglichen Reaktionswegen in saurem Milieu kommt es zum "Scrambling" des Bilirubins, das ionisch (protonenkatalysiert) oder radikalisch (z.B. mit molekularem Sauerstoff) ablaufen kann. Dabei entsteht neben BV IX α auch das III α - (11b) und XIII α - (11c) Isomer (MANITTO und MONTI, 1973). Das Verhältnis der entstehenden Biliverdin- Isomere ist abhängig vom Konzentrationsverhältnis der Reaktionspartner BR und DMSO, vom Überschuß an Oxidationsmittel DDQ, von der Reaktionszeit und anderen Faktoren (McDONAGH und PALMA, 1980).

Zur Aufarbeitung wurde die grüne BV- Lösung mit einem großen Volumen an CHCl₃ verdünnt und die organische Phase anschließend ausgiebig mit Wasser gewaschen. Dabei mußte H₂O langsam in die Chloroformphase egegossen und nur leicht gerührt werden. Bei Extraktion im Scheidetrichter (Schütteln) bildete sich ein flockiger dunkelgrüner Niederschlag, der nicht mehr in Lösung ging und die Endausbeute an BV erheblich reduzierte.

Die Reinigung erfolgte anfangs durch präparative Schichtchromatographie. Wurde das Produkt jedoch nicht unmittelbar feucht von der Platte abgekratzt, bildete die freie Säure beim Antrocknen an das Kieselgel eine Reihe von gelben, blauen und roten Abbauprodukten (vergleichbar zu OEBV und DHOEBV, siehe B. 1.1.2.2). Auch beinhaltete die Elution des BV's vom Adsorbens mit Eisessig einen großen Materialverlust (auch nach erschöpfendem Spülen KG noch stark grün gefärbt).

Auch mittels Säulenchromatographie an KG wurden keine besseren Ergebnisse erzielt. Mit dem Laufmittelsystem CHCl₃/10% MeOH ließ sich zwar oxidiertes BR gut abtrennen, nicht aber die Abbauprodukte. Die analytische Chromatographie auf HPTLC- Platten wies neben dem grünen Fleck für BV IX α (RP, CHCl₃/7% MeOH: R_f=0.74) immer noch eine gelbe (für Bilirubin, färbte sich auf der Platte durch Oxidation an der Luft binnen weniger Minuten grün) bei R_f=0.98, sowie eine blaue Zone, polarer als BV (R_f=0.34), auf. Diese "Verunreinigung", die auf der NP- Platte stets knapp unterhalb der BV- Bande

lief, konnte möglicherweise auf einen Artefakt zurückzuführen sein, der erst auf der Platte gebildet wurde (McDONAGH und PALMA, 1980), bzw. auf ein Additionsprodukt an einem der Vinylsubstituenten. Die Exo- Vinylgruppen der IX α - und XIII α - Isomere von BR und BV addieren unter sauren Bedingungen z.B. Alkohole unter Bildung der Methoxybiline bzw. ihrer Dimethylester (MANITTO und MONTI, 1974/75).

(11a) Biliverdin IX α

(R₁/3 : CH₃,

R₂/4 : CHCH₂)

(11b) Biliverdin III α

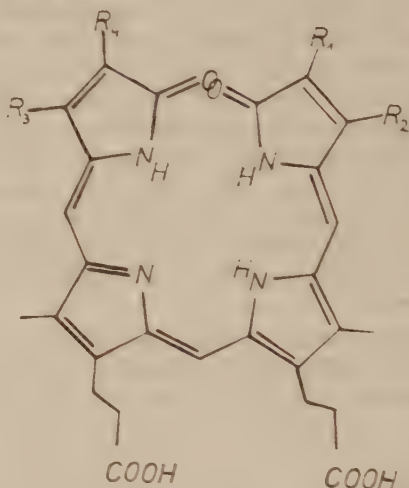
(R₂/3 : CH₃,

R₁/4 : CHCH₂)

(11c) Biliverdin XIII α

(R₁/4 : CH₃,

R₂/3 : CHCH₂)



Die beste Aufarbeitungsmethode war die Reinigung auf der Stufe des Dimethylesters:

Roher Biliverdin IX α - dme (12a) wurde durch Veresterung des ungereinigten BV's (11a, siehe C. 2.1.4) mit methanolischer BF₃-Lösung in MeOH dargestellt (STOLL und GRAY, 1977).

Eine Reinigung des Dimethylesters konnte problemlos mittels Säulenchromatographie an Kieselgel erzielt werden. Mit CHCl₃/5% Aceton wurde zuerst restliches BR (bzw. BR- Dimethylester) ausgewaschen; dann wurde ein Stufengradient von 5 bis 20% Aceton angelegt, bei dem BV IX α - dme mit ca. 10% Aceton eluierte. Am Start blieb eine grüne Zone zurück (unverestertes BV).

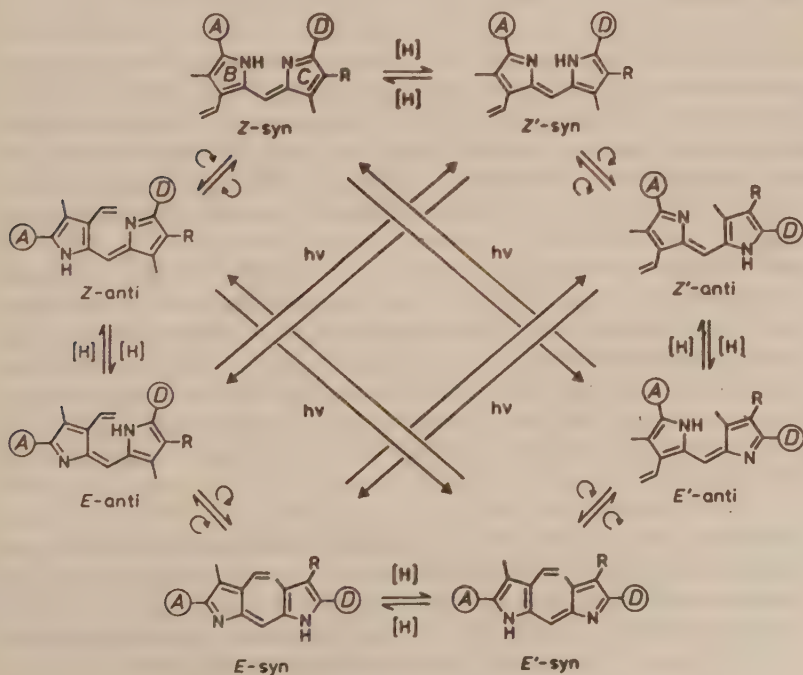
Die analytische DC wies vor der Reinigung auf minimale Spuren von III α - und XIII α - dme, sowie auf die oben erwähnten blauen Artefakte, hin. Nach der Abtrennung auf der Säule wurde BV IX α - dme in hoher Ausbeute (80 bis 90% bezogen auf eingesetztes BV) rein erhalten.

1.2.1.2 Konformations- und Konfigurationsisomere des Biliverdin IX α -Dimethylesters

BV IX α -dme (12) zeigt in kleinen Konzentrationen deutliche thermo- und solvatochrome Eigenschaften, die auf ein Nebeneinander von zwei Strukturformen der Chromophore in Lösung hinweisen. (Die niedrige Konzentration schließt Aggregationsphänomene aus, auch eine Lactam-Lactim Tautomerie (FALK et al., 1978a) kommt in diesem Fall nicht in Betracht.) Das Verhältnis der beiden Spezies zueinander ist abhängig vom umgebenden Lösungsmittel, die Daten wurden in statischen Fluoreszenzmessungen (BRASLAVSKY et al., 1983) ermittelt.

In Lösung (z.B. CHCl₃) ist die helical gekrümmte all- syn- Z Form (wie bei OEBV/DHOEBV- Chromophoren) vorherrschend (Emission bei 710nm). Daneben entspricht eine zusätzliche Emissionsbande bei 660nm (z.B. in MeOH) einer im Bereich um C-10 gestreckten Anordnung (Schema 5).

Schema 5: Helicale und gestreckte Konformations-/Konfigurationsisomere an C-10 bei Biliverdin IX α -dme (12) (BRASLAVSKY et al., 1985)



Dies wird auch durch CD- Messungen bestätigt (BRASLAVSKY et al., 1983). Das langwellige Signal liegt unabhängig vom Lösungsmittel (im Gegensatz zur entsprechenden UV/Vis- Absorptionsbande) immer bei der gleichen Wellenlänge. Es deckt sich entweder mit dem Absorptionmaximum, oder ist dagegen rotverschoben (Letzteres repräsentiert die all-syn Z Konformation).

Durch zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen konnten weitere Grundzustandsformen (im Nano- und Pikosekundenbereich) ermittelt werden. Diese Ergebnisse, neben vergleichenden photochemischen Umwandlungen an IX γ - und IX δ - Isomeren sowie an BV III α - dme, ergaben, daß sich der Streckungsvorgang der gekrümmten Konformation in Lösung (im Grund- und im Anregungszustand) auf Umformungen im Bereich der Ringe B und C beschränkt. Dabei bleibt die syn- Z Geometrie der Ring A/B- und der Ring C/D- Teilstruktur erhalten.

Es entstehen acht C-10 Isomere (bei unsymmetrisch substituierten Biliverdinen entsprechend mehr) durch Drehung um die Einfachbindung C-9/ C-10 bzw. nach Protonenverlagerung von N-23 nach N-22 um C-10/C-11 (Schema 5). Dabei lassen sich die gekrümmten syn- Z und die gestreckten anti- E Formen durch direkte E/Z- Photoisomerisierung selektiv ineinander umwandeln.

Wird eine ethanolische BV IX α - dme Lösung bei 173K belichtet, verschiebt sich das photostationäre Gleichgewicht gegenüber der Zusammensetzung im Grundzustand zugunsten der gestreckten Formen. Beim Aufwärmen auf Raumtemperatur wird die ursprüngliche Zusammensetzung wiederhergestellt (thermisch reversible Photoisomerisierung im Mikrosekundenbereich).

Die thermische Stabilität von gestrecktem BV- dme scheint verschieden zu sein, je nachdem auf welchem Weg es aus all-syn- Z entstanden ist. Auf photochemischem Weg entsteht anti- E, durch Erwärmung anti- E und syn- E. Letzteres vermag durch Kombination von Tautomerisierung und Drehung der C-C Einfachbindung, welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt, all-syn- Z zurückzubilden (BRASLAVSKY et al., 1983).

Von diesen 10 E- Isomeren zu unterscheiden sind die Konfigurationsisomere, die durch Bestrahlung im Rubinoidzustand erhalten werden. Diese Produkte sind thermisch stabiler, treten aber nicht bei Bestrahlung der gewöhnlichen Biliverdine in organischen Lösungsmitteln auf (siehe Schema 3. FALK et

al., 1980). Hierbei handelt es sich um eine selektive Z/E-Isomerisierung der Dipyrromethenon- Teilchromophore (exocyclische Doppelbindung) an C-4 und C-15.

1.2.1.3 Versuch der Z/E- Isomerisierung bei der freien Säure

KUFER (1980) untersuchte das Verhalten von BV IX α als freie Säure und als Dimethylester gegenüber Reduktionsmitteln wie NaBH $_4$, Sulfit, Dithionit und 2- Mercaptoethanol. Neben den echten Rubinen (mit NaBH $_4$) konnte er auch Ansätze zur Charakterisierung von rubinoiden Verbindungen (mit Dithionit und Mercaptoethanol) liefern. Das Reaktionsprodukt von BV IX α mit Thiol konnte allerdings nicht in höheren Konzentrationen isoliert werden, da es bei der Aufarbeitung (Ausschütteln mit CCl $_4$ /H $_2$ O) sofort das Thiol eliminierte. Für die Präparation von Z/E- isomeren Verdinen über den Rubinoidzustand sollte diese leichte Eliminierung jedoch von Vorteil sein. Die Umsetzung von BV IX α wurde (aus Gründen der Löslichkeit) in MeOH und DMSO, mit Mercaptoethanol als Nucleophil, durchgeführt (zur Theorie siehe B. 1).

Ca. 200mg gereinigtes BV IX α (11a) wurde unter Spülen mit Argon in DMSO gelöst (λ_{max} =684, 385nm) und mit ca. 20 Vol.% Mercaptoethanol versetzt. Die Farbe der Lösung schlug sofort von Dunkelgrün nach Orange um (λ_{max} =415, 440nm). Die Anlage- rung erfolgte auch mit 10 Vol.% Thiol quantitativ, benötigte dann aber ungefähr 15min. Das Rubinoid wurde (analog zu OEBV unter Schutzgas und Eiskühlung, siehe B. 1.1.2.1) 20min mit Weißlicht bestrahlt. Dabei verschob sich die Absorptionsban- de nicht; die Intensität des langwelligen Peaks des Doppel- maximums ging jedoch etwas zurück, er erschien nur noch als Schulter in der 415nm Bande.

Anschließend wurde die Reaktionsmischung im grünen Sicher- heitslicht mit CHCl $_3$ /H $_2$ O extrahiert. War bei OEBV/DHOEBV be- reits mit diesem Schritt die Eliminierung des Thiols verbun- den, so erhielt man hier eine nach wie vor stark gelb ge- färbte Chloroformphase (λ_{max} =446nm, Sh660nm; Q $_{446/660}$ =14, wässrige Phase farblos). Wurde die Chloroformlösung mit Eis- essig angesäuert, färbte sie sich grün. Das Absorptionsspek- trum zeigte allerdings neben den Banden für das Verdin (654, Sh710, 382nm) noch eine ausgeprägte Absorption im Rubinoid- bereich (440nm). Nach Neutralwaschen der organischen Phase mit Wasser erhielt man erneut ein eindeutiges Rubinoidspek- trum (λ_{max} =446, Sh652, Sh385nm; Q $_{446/652}$ =5).

Wurde derselbe Versuch (280mg BV IX α) in MeOH durchgeführt (bei OEBV genügten schon sehr "geringe" Thiolmengen zur vollständigen Umsetzung, siehe B. 1.1.2.3), schlug die Farbe der BV- Lösung (λ_{max} =666, 376, Sh320nm) bereits mit 0.33 Vol. % Mercaptoethanol nach Gelb um (λ_{max} =Sh415, 440nm). Nach Belichtung (λ_{max} =415, Sh440nm) wurde die methanolische Lösung mit einer äquivalenten Menge 1N HCl geschüttelt, dabei wurde das Thiol eliminiert. Nach der Extraktion mit CHCl₃/H₂O lag im Neutralen jedoch erneut das Rubinoid in der organischen Phase vor (λ_{max} =440, Sh680nm; Q_{440/680}=23). Diese Versuche zeigten, daß das Gleichgewicht zwischen Verdin und Rubinoid bei der freien Säure stark auf die Seite des Additionsprodukts verlagert war (im Gegensatz zu OEBV/DHOEBV und auch im Gegensatz zu KUFER, 1980).

Wurde die Chloroformphase (in der das Rubinoid überwog) abgezogen (Vakuum, Wasserbadtemperatur $\leq 30^\circ\text{C}$) und durch MeOH (angesäuert mit 1N HCl) ersetzt, erhielt man das Kationenspektrum eines Biliverdin- Folgeproduktes (λ_{max} = Sh700, 678, 378nm, siehe B. 1.2.1.1; vermutlich im Gemisch mit BV IX α). Dieses Ergebnis entsprach den Untersuchungen von KUFER (1980). Im Gegensatz zur voll säurereversiblen Addition der Mercaptogruppe an C-10 der Biliverdine von MANITTO und MONTI (1979) erhielt er ebenfalls nach Eliminierung des Thiols ein Folgeprodukt mit kürzerwelligerer Absorption, und nicht das ursprüngliche BV (als Kation in MeOH: λ_{max} =697nm).

Wurde das Belichtungsprodukt, gelöst in MeOH (gelb), an DEAE Cellulose (CHCl₃/Eisessig) chromatographiert, ließ sich das Rubinoid nur unvollständig abtrennen (Schulter im Bereich von $\approx 400\text{nm}$). Die eluierten Fraktionen wiesen Maxima von 670 bis 690nm auf. Die langwellig absorbierenden Fraktionen chromatographierten in der analytischen DC (RP, CHCl₃/7% MeOH) bei einem R_f-Wert von 0.26, der identisch war zu unbehandeltem BV IX α . Die bei 670nm absorbierende Form war deutlich polarer (R_f=0.55). Keine der Fraktionen zeigte eine Reaktion auf Weißlichtbestrahlung (zweidim. DC, siehe C. 1.3), die auf ein Vorliegen von lichtempfindlichen Z/E- Konfigurationsisomeren schließen ließ.

In der Folge wurde auch versucht, ZZE- Isomere auf dem Weg über Bilirubin IX α (2, siehe A. 2.1) darzustellen. Dazu wurden 50mg BR IX α in 30ml DMSO gelöst und eine Stunde unter Argon mit Weißlicht bestrahlt. Die zu Beginn orange Lösung verfärbte sich im Laufe der Belichtung dunkelbraun (λ_{max} =

451nm). Die anschließende Oxidation zu BV und dessen Aufarbeitung wurde im Grünlicht, wie in C. 2.1.3 beschrieben, durchgeführt. Das Produkt zeigte jedoch weder im neutralen (CHCl_3 : λ_{max} =648, 375nm), noch im sauren Milieu (CHCl_3 /Eisessig: λ_{max} =662, 376nm) eine spektrale Änderung bei nachfolgender Weißlichtbestrahlung. Auf der DC konnte neben BR IX α und BV IX α (+Artefakt, siehe B. 1.2.1.1) erneut ein polares grünes Produkt identifiziert werden, welches ebenfalls bei Belichtung keine Änderung im Laufverhalten zeigte. Es handelte sich dabei jedoch weder um ein BV III α -, XIII α -, noch um ein τ - oder δ - Isomer.

1.2.1.4 Z/E- Isomerisierung beim Dimethylester

15E- und 4E- BV IX α - dme konnten von FALK et al. (1978a) durch Bestrahlung von, an Al_2O_3 adsorbiertem, BV IX α - Dimethylester dargestellt werden. Es sollte in der Folge versucht werden, Konfigurationsisomere von BV IX α - dme auch in Lösung (analog zu OEBV und DHOEBV) über den Rubinoidweg herzustellen.

Ca. 0.5g BV IX α - dme (12) wurden in 0.5ml CHCl_3 angelöst und in 19.5ml DMSO aufgenommen (λ_{max} =672, 382nm). Nach ausgiebigem Spülen mit Argon wurden 15 Vol.% Mercaptoethanol zuge tropft, dabei färbte sich die Lösung gelb (λ_{max} = 408, Sh438nm). Nach 20min Belichtung unter Schutzgas und Eiskühlung wurde die Lösung zwischen CHCl_3 und H_2O verteilt. Wie bei der freien Säure kam es auch hier nicht zu einer ausreichenden Eliminierung des Thiols (λ_{max} =395, Sh440, Sh650nm).

Die Probe wurde, in einer Pasteurpipette als Säule, an KG 60H chromatographiert (CHCl_3 /Aceton). Die aufgefangenen Fraktionen enthielten (in der Reihenfolge der Elution):

- a) BV IX α - dme (NP, CHCl_3 /5% MeOH, R_f =0.52),
- b) ein blaues Produkt (Artefakt auf Platte? kein BV XIII α !, R_f =0.49) und
- c) eine bei R_f =0.23 laufende grüne Substanz.

Diese Fraktion (im Gemisch mit a und b) besaß in CHCl_3 Maxima bei 644, 379 und 312nm, welche sich durch 180sec Weißlichtbestrahlung (Leitz Projektor, siehe C. 1.5) nach 650, 377, 310nm verschoben (unbehandelter BV IX α - dme in CHCl_3 : λ_{max} =650, 378nm). Dabei ging die Intensität der langwelligen Bande geringfügig um $\approx 6\%$ zurück, die der S_2 - Bande nahm um $\approx 10\%$ zu. Die belichtete Probe zeigte auf der nachfolgenden

DC ein identisches Laufverhalten zu ursprünglichem ZZZ- BV IX α - dme. (Die Säule blieb nach Beendigung der Elution stark gelb gefärbt.)

Dies war ein erster Ansatz, daß im Gegensatz zur freien Säure photolabile, aber thermisch stabile Produkte entstanden waren. Bei ihnen könnte es sich um Z/E- Konfigurationsisomere handeln, da sie mit Licht zu ZZZ revertierten.

Da, wie bei OEBV/DHOEBV (siehe B. 1.1.2.2) gezeigt, Mercaptoethanol beim Verbleib in der Pigmentlösung äußerst ungünstigen Einfluß auf die Beständigkeit von ZZE- Isomeren ausübte, mußte zuerst versucht werden, das Thiol schneller und irreversibel nach der Belichtung des Rubinoids vom Chromophor abzutrennen. Bei weiteren Präparationsansätzen wurde deshalb als Nucleophil Ethanthiol (siehe B. 1.1.3.3) eingesetzt.

0.35g BV IX α - dme wurden in 30ml DMSO gelöst und unter Argon mit ca. 12 Vol. % Ethanthiol versetzt. Nach 20min Reaktionszeit erhielt man eine grüngelbe Lösung, die unter weiterer Gaseinleitung und Kühlung 30min mit Weißlicht bestrahlt wurde. Während der Belichtung färbte sich die Lösung rein gelb (λ_{max} =407, 442nm). Anschließend wurde die Rubinoidlösung mit 20ml H₂O verdünnt und überschüssiges Ethanthiol im Vakuum (Wasserbadtemperatur 25°C) abgezogen. Die gelbgrüne Reaktionsmischung wurde in 40ml CHCl₃ (angesäuert mit drei Tropfen Tfa) eingegossen, dabei schlug die Farbe nach Grün um. Bei diesem Verfahren blieb das Verdin auch nach Neutralisation der Chloroformphase (H₂O) erhalten (λ_{max} =650, 389nm, wässrige Phase gelb). Das entstandene Gemisch wurde nach Reduzierung des Lösungsmittels über eine KG- Säule (10 bis 50% Aceton in CHCl₃) chromatographiert.

Mit 10% Aceton konnte eine breite grüne Bande (nicht isomerisierter BV IX α - dme), mit 30% eine weitere blaugrüne Zone eluiert werden. Die analytische DC der aufgefangenen Fraktionen (NP, CHCl₃/10% Aceton) ergab in der Reihenfolge der Elution von der Säule:

- a) reiner ZZZ- BV IX α - dme (Rf=0.48, überprüft durch Cochromatographie mit unbehandeltem Dimethylester),
- b) ZZZ mit blauer Verunreinigung (Rf=0.45),
- c) b mit polareren gelben/roten Verunreinigungen und
- d) polare grüne "Belichtungsprodukte" bei Rf=0.063 und 0.042 (wie mit Mercaptoethanol).

Diese konnten durch höhere Acetonkonzentrationen (40%) in drei Banden bei Rf=0.65, 0.57 und 0.52 (neben ZZZ, Rf=0.91)

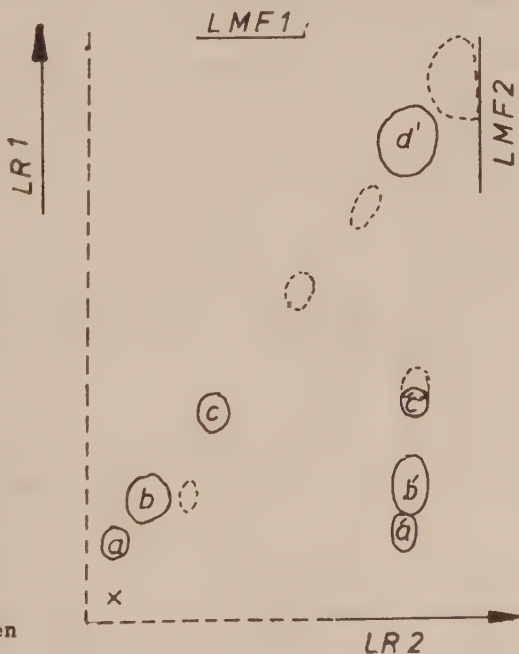
aufgespalten werden. In der zweidimensionalen DC (siehe C. 1.3) zeigten diese drei polaren grünen Produkte nach Belichtung auf der Platte identisches Laufverhalten wie ZZZ- BV IX α - dme (Abb. 22).

Daraus konnte geschlossen werden, daß in Lösung über die Belichtung des Rubinoids drei Konfigurationsisomere des IX α -Dimethylesters gewonnen werden können, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um die 5E,10Z,15Z-, ZZE- und EZE- Isomere (wie auch z.B. bei Etiobiliverdin IX τ , 4 gefunden) handelt.

(Ein qualitativ vergleichbares Resultat konnte letztlich auch mit Mercaptoethanol als Nucleophil, wenn es mit rauchender HCl eliminiert wurde, erzielt werden. Jedoch war die Gesamtausbeute an Verdin viel geringer, da ein großer Teil des Rubinoids während der Säulenchromatographie unverändert abgetrennt wurde.

Abb. 22:

Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der Produkte aus der Isomerenpräparation bei BV IX α dme (NP, CHCl₃/Aceton 6:4): Laufrichtung 1 (unbelichtet) Laufrichtung 2 (nach einer Minute Weißlichtbestrahlung unter Argon auf der Platte); a,b,c: Photoisomere vor und á,á',á'': nach Belichtung, á) ZZZ- BV IX α dme, restliche Flecken gelbe und violette Verunreinigungen



1.2.2 Biliverdin IX β , τ und δ - Dimethylester und daraus hervorgehende gestreckte Verbindungen

Das Gemisch der isomeren IX α - (12), β - (13), τ - (14) und δ - (15) Biliverdindimethylester wurde, ausgehend vom Hämin,

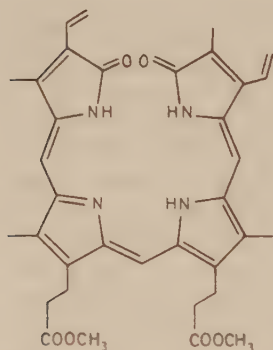
durch oxidative Ringöffnung mit Sauerstoff und Hydrazin, und anschließender Veresterung mit methanolischem Bortrifluorid (nach einer Vorschrift von BONNETT und McDONAGH, 1973) dargestellt (siehe C. 2.1.5).

Zur Aufreinigung und Auftrennung des Pigmentgemisches wurde wahlweise die präparative DC (O'CARRA und COLLERAN, 1970; KUFER, 1980), oder die Säulenchromatographie an einer Kieselgel- Fertigsäule (siehe C. 1.1.3) eingesetzt. Mit der zuletzt erwähnten Methode konnte eine zufriedenstellende Trennung der Isomere α und τ in einem Arbeitsgang erzielt werden (siehe C. 2.1.5).

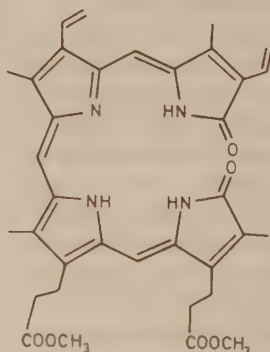
Als Ausgangsprodukt für die gestreckten Chromophore diente gereinigter Biliverdin IX τ - dme (14).

Phorcabilin- dimethylester (16) erhielt man nach einer Vorschrift von PETRIER (1978) durch Erhitzen des in DMSO gelösten Dimethylesters unter weitgehendem Sauerstoffausschluß (siehe C. 2.1.6).

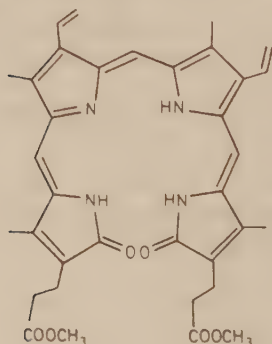
(12) Biliverdin IX α - dme



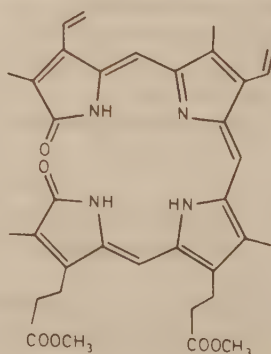
(13) Biliverdin IX β - dme



(14) Biliverdin IX τ - dme

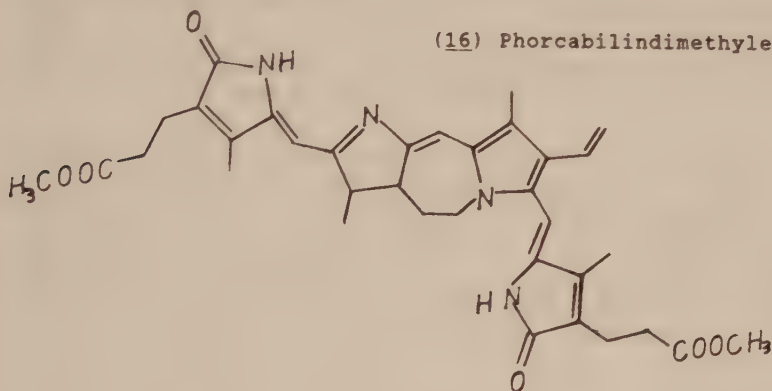


(15) Biliverdin IX δ - dme

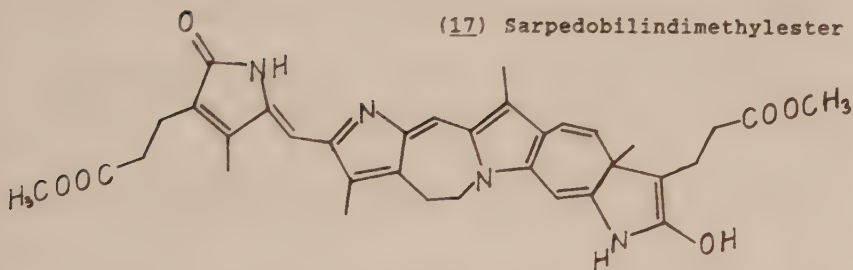


Sarpedobilin- Dimethylester (17) wurde aus Phorcabilin- dme durch Belichten des Pigments in Methanol unter Argon (CHOUS- SY und BARBIER, 1976; BOIS-CHOUSSY und BARBIER, 1983; siehe C. 2.1.8), Isophorcabilin- Dimethylester (18) durch Kochen von (16) in schwefelsaurem Methanol (PETRIER, 1978; siehe C. 2.1.7) dargestellt.

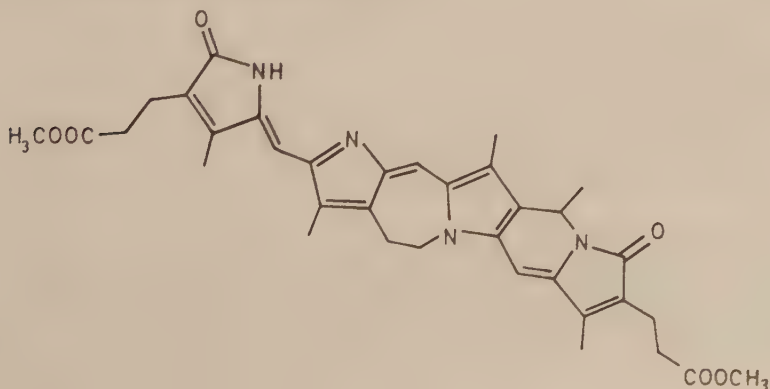
(16) Phorcabilindimethylester



(17) Sarpedobilindimethylester



(18) Isophorcabilindimethylester



1.2.2.1 Versuch der Z/E- Isomerisierung beim Biliverdin IX γ -Dimethylester

Nach der erfolgreichen Darstellung von an C-4 und C-15 E-konfigurierten Isomeren des IX α - Dimethylesters (12, siehe B. 1.2.1.4), sollte als nächstes versucht werden, ob diese Methode (Belichtung des Rubinoids) auch auf den IX γ - Dime-thylester (14) übertragen werden kann. Dies wäre besonders interessant, da ausgehend von BV IX γ - dme eine Reihe von ge-streckten Chromophoren erhalten werden können (Schema 6).

5mg BV IX γ wurden in 20ml DMSO gelöst (λ_{max} =644, 375nm, ϵ_{644} =10300), mit Argon gesättigt und im Grünlicht mit 5 Vol. % Ethanthiol umgesetzt (390, Sh420nm, ϵ_{390} bei Annahme einer 1:1 Umwandlung in das Rubinoid:23500). Nach 30 minütiger Weißlichtbestrahlung (Argon, Eiskühlung) hatte sich das Maximum geringfügig (392, 410nm) unter leichtem Intensitäts-rückgang verschoben. Überschüssiges Ethanthiol wurde am Va-kuum abgezogen, die Reaktionsmischung anschließend auf Eis (destill. H₂O) gegossen und mit CHCl₃ extrahiert. Im Gegen-satz zu BV IX α - dme konnte man hier, wie bei OEBV und DHOEBV, das Thiol auch ohne Ansäuern bleibend vom Chromophor eliminieren.

Der Chlorformextrakt (λ_{max} =645nm) wurde ohne Volumenreduzie-rung (um eine erneute Anlagerung des Nucleophils zu vermei-den) sofort über eine Kieselgelsäule (1 bis 15% Methanol in CHCl₃) aufgereinigt/getrennt. Die analytische DC (NP, CHCl₃/MeOH 98:2) der aufgefangenen Fraktionen zeigte eine große Anzahl farbiger Produkte (Tabelle 8).

Neben den zahlreiche gelben (Rubinoid bzw. Rubin), roten und violetten (Oxidationsprodukte des BV- dme's) Flecken ent-standen auch mehrere blaue Produkte. Darunter waren einige, die sich bei Belichtung als photolabil erwiesen. Zwei (Rf= 0.6, 0.53) ergaben durch Weißlichtbestrahlung ZZZ- BV IX γ -dme, es könnte sich dabei also um E- Konfigurationsisomere handeln. Zwei Produkte änderten sowohl Farbe (Blau - Grün), als auch Laufverhalten (0.41, 0.27), waren aber nicht iden-tisch zu ursprünglichem BV IX γ - dme. Die restlichen Pigmente zeigten sich durch die Belichtung unbeeinflusst (siehe Tabel-le 8).

Die blauen Pigmente, die nicht als Isomere des Biliverdin-Dimethylesters identifiziert wurden, waren nach DC nicht mit anderen Chromophoren der IX γ - Reihe (Phorca- Isophorca- Sar-pedobilin- dme) identisch.

Tabelle 8: Übersicht über die bei der Belichtung des Rubinoids von BV IX τ - dme (14) entstandenen Pigmente und ihr Verhalten gegenüber weiterer Belichtung

Farbe ¹	Rf- Wert	Identifizierung	Belichtung ²
grün	0.83	BV IX τ - dme	keine Änderung im Laufverhalten
gelb	0.79	kein Phorca-bilin- dme (0.7)	
blau	0.78		
gelb	0.72		
blau	0.67	kein Isophorca-bilin- dme (0.4)	BV IX τ - dme (0.83)
blau	0.6		
gelb	0.56		
blau (<) ³	0.53		
rot	0.45	kein Sarpedo-bilin- dme (0.2)	wurden unpolarer: kein BV IX τ ($\approx$ 0.7)
blau (<)	0.41		
violett (<)	0.39		
rot (<)	0.37		
hellblau	0.27	keine Änderung	keine Änderung
blau	0.25		
violett	0.15		

- 1) Farbe des Flecks auf der DC (änderte sich oft sehr schnell an der Luft, z.B. Gelb - Blau: Oxidation der Rubine)
- 2) Belichtung auf der DC- Platte unter Argon (siehe C. 1.3)
- 3) (<): schwacher Fleck

1.2.2.2 Zyklisierungsreaktionen bei Biliverdin IX τ - und δ -Dimethylestern

IX τ - (14) und δ - (15) Biliverdin- Dimethylester können Zyklisierungsreaktionen eingehen, wobei die Vinylgruppe, die bei diesen beiden Pigmenten an Position C-8 liegt, als reaktives Zentrum fungiert (Schema 6, Typ A).

Die Voraussetzung für einen Ringschluß liegt in einer Z/E-Isomerisierung der mittleren Methinbrücke, die thermisch oder photochemisch erfolgen kann (BOIS-CHOUSSEY und BARBIER, 1978). Dabei wird die bevorzugte all- syn Z Struktur der Pigmente in Lösung an C-10 in anti- E umgewandelt. die Konfiguration an den Methinbrücken zwischen den Ringen A/B und C/D bleibt unverändert.

In einem zweiten Schritt kommt es dann zu einer Michael ähnlichen intramolekularen Addition des Pyrrolstickstoffs N-23 an die Vinylgruppe, die durch ihre Konjugation mit benachbarten elektrophilen Zentren (C=N₂₂, C₁₉=O) aktiviert wird. Diese Reaktion wird durch polare aprotische Lösungsmittel

(z.B. DMSO) gefördert, da durch sie die zwitterionische Struktur des Übergangszustandes ($N_{22}^-/N_{23}^+ \rightarrow N_{23}^+/C_{19}-O^-$) stabilisiert wird (BOIS-CHOUSSY und BARBIER, 1978).

In Abhängigkeit von Lösungsmiteileinflüssen, Temperatur, etc. kommt es erneut zu einer Ringspaltung und Rückbildung von BV IX τ /8- dme, oder zu einer Protonenverschiebung und damit zu Bildung der Neobiliverdine IX τ - dme (=Phorcabilin- dme, 16) und IX5- dme (BRASLAVSKY et al., 1985; Schema 6). Die anti- E Konfiguration wird durch den zentralen Siebenring fixiert.

Durch Belichtung von Phorcabilin- dme (16) in protischen Lösungsmitteln kann eine weitere Zyklisierung eingeleitet werden (nicht thermisch!; Schema 6, Typ B):

Den ersten Schritt bildet vermutlich erneut eine Z/E- Isomerisierung, in diesem Fall an der exozyclischen Methinbrücke C-15 (syn- Z zu syn- E (BOIS-CHOUSSY und BARBIER, 1978). Anschließend kommt es zu einer Addition der C-13 Vinylgruppe an das elektrophile Zentrum des C-17 Atoms (entsteht durch Enolisierung der C-19 Carbonylgruppe). Zuletzt erfolgt, unterstützt durch das Lösungsmittel, die Reprotonierung (Schema 6). Die syn- Z, anti- E, syn- E Konfiguration von Sarpedobilin- dme (17) wird durch zwei Siebenringe zwischen den Pyrrolringen B/C und C/D fixiert, das Pigment liegt dadurch, ebenso wie Isophorcabilin, in einer relativ gestreckten Konformation vor.

Die dritte Zyklisierungsreaktion wird nicht auf photochemischem Weg erreicht, sondern ist auf die Tendenz der Vinylgruppe zurückzuführen, protonenkatalysiert Alkohole (z.B. MeOH) zu addieren (Schema 6, Typ C):

Auf die Fähigkeit der exo- Vinylgruppen an C-18 bei BV IX α - und BV XII α - dme zu dieser Reaktion wurde schon verwiesen (siehe B. 1.2.1.1). Die Vinylgruppen an C-2 (BV III α), C-3 (BV IX α , XIII α) und C-17 (BV XIII α - dme) reagieren jedoch nicht (MANITTO und MONTI, 1974).

Zur Addition neigt vor allem die Vinylgruppe an C-13 (nucleophiler als C-8, BOIS-CHOUSSY und BARBIER, 1978)). Pigmente, die über eine Vinylgruppe an dieser Position verfügen (BV IX β , τ , Phorcabilin) bilden bereits beim Stehen in schwefelsaurem Methanol in hohen Ausbeuten die entsprechenden Methanoladdukte (13- Methoxyethyl- BV IX β - dme -54%; 13- Methoxyethyl- BV IX τ - dme -75%; 13- Methoxyethylphorcabilin- dme -75%; Schema 6). Im Vergleich zu dieser Reaktion beträgt die

Addition an C-18/BV IX α - dme nur 2%, an C-8/BV IX δ - dme nur 3% und an C-8/BV IX γ - dme 5%.

Bei etwas energischeren Bedingungen (Erhitzen) entsteht aus Phorcabilin- dme (16) über das Zwischenprodukt 13- Methoxyethylphorcabilin IX γ - dme Isophorcabilin- dme (18). Dabei kommt es erst zu einer Drehung um die C₁₄/C₁₅- Einfachbindung und anschließend zur Substitution der 13- ständigen -OCH₃ Gruppe an den Pyrrolstickstoff N-24. Isophorcabilin- dme verfügt entsprechend über ein syn- Z, anti- E, anti- Z Konfiguration und ist durch den zentralen Siebenring (analog Phorcabilin- dme) und den zusätzlichen Sechsring zwischen den Pyrrolringen C/D in gestreckter Form fixiert.

Entsprechende Behandlung von BV IX γ - dme (14) führt zu 8,13-Dimethoxyethyl- BV IX γ - dme und durch Cyclisierung zwischen Ring C/D (entsprechend zu Phorcabilin) zu 8- Methoxyethylisobiliverdin IX γ . Dieses Pigment besitzt durch seine syn- Z, syn- Z, anti- Z Konfiguration ebenfalls eine (nicht so stark wie Phorca-/Isophorcabilin) gestreckte Konformation. Ausgehend vom 13- Methoxyprodukt des BV IX γ - Dimethylesters kann durch Belichtung in neutralem DMSO erneut die Zyklisierung/Isomerisierung zu Methoxyethylphorcabilin eingeleitet werden (Schema 6, Typ A).

1.2.2.3 Versuch der Z/E- Isomerisierung beim Phorcabilin-Dimethylester

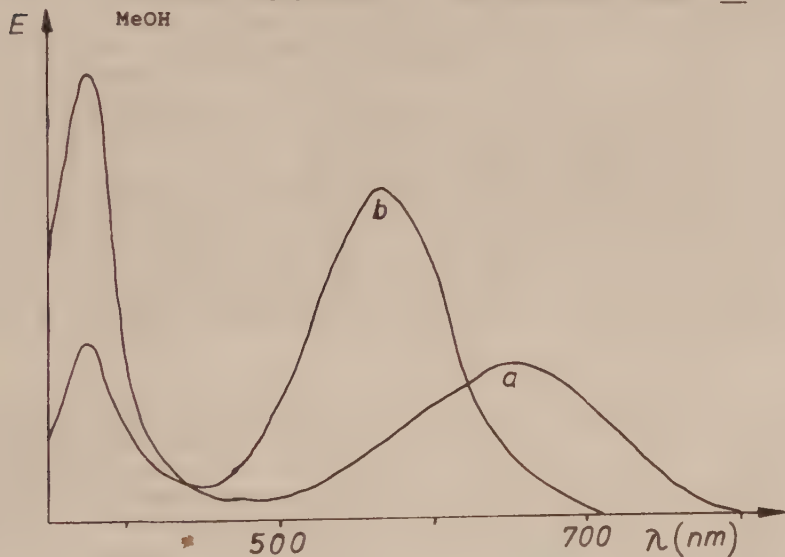
Für den Vergleich mit dem. im nativen Protein gestreckten, Phytochromchromophor (3a) sollten vor allem die gestreckten Phorca- Isophorca- und Sarpedobiline interessant sein. Da diese Pigmente weitgehend durch intramolekulare Verbrückung starr fixiert sind, sollte eine Z/E- Isomerisierung, wenn überhaupt möglich, nur an C-4 (17/18) bzw. an C-4 und/ oder C-15 (16) auftreten.

Aus experimentellen Gründen (leichter zugänglich) wurde ein Isomerisierungsversuch zuerst an Phorcabilin- dme unternommen. Die Methode entsprach der von FALK et al. (1980), wie sie modifiziert schon auf synthetisches OEBV/DHOEBV und Biliverdin IX α / γ - dme angewendet wurde (siehe B.1.1.2, 1.2.1.4 und 1.2.2.1).

Das Absorptionsspektrum von Phorcabilin- dme in CHCl₃ zeigte ein ausgeprägtes Maximum im sichtbaren Spektralbereich (553nm) und nur eine vergleichsweise niedrige S₂- Bande

(360nm). Die gestreckte Konformation (syn- Z, anti- E, syn- Z) des Chromophors wurde deutlich durch das im Vergleich zu BV stark hypsochrom verschobene Absorptionsmaximum (Abb. 23), verbunden mit dem Verhältnis der Extinktionen von sichtbarer zur UV- Bande: $Q_{vis/uv}$ betrug 5.6 und lag im Bereich von nativem PC (≈ 6.4 , Chromophor gestreckt, anti- Z, syn- Z, anti- Z).

Abb. 23: Absorptionsspektrum von BV IXr- dme (14) und seines Zyclisierungsproduktes Phorcabilin- dme (16) in MeOH



a) Die Addition von 2- Mercaptoethanol an Phorcabilin- dme/ 16) wurde, wie bei den anderen Pigmenten, in DMSO durchgeführt. Im Grünlicht und unter Argonatmosphäre wurde die dunkelviolette Lösung ($\lambda_{max} = 568$, Sh_{360nm} , $Q_{vis/uv}=4.2$) mit ca. 3 Vol. % Thiol umgesetzt. Die Anlagerung erfolgte sehr rasch (wenige Minuten) und man erhielt eine gelbgrüne ($\lambda_{max}=414nm$, Restabsorption $\approx 610nm$), mit 10 Vol.% Thiol eine rein gelbe Rubinoidlösung (ϵ des Rubinoids unter der Annahme einer 1:1 Umsetzung und des Extinktionskoeffizienten von Phorcabilin- dme in MeOH= $45000/PETRIER$ (1978) bestimmt zu 41000).

Die Reaktionsmischung wurde unter Argon und Eiskühlung 10min mit Weißlicht (siehe C. 1.5) bestrahlt. Dabei ging die Intensität der Rubinoidbande deutlich zurück (ca. ein Drittel!), zugleich verschob sich das Maximum hypsochrom auf 405nm.

Die "Belichtungsprodukte" wurden mit CHCl_3 /Eis (dest. H_2O) extrahiert, dabei wurde Thiol problemlos eliminiert. Das Reaktionsgemisch in CHCl_3 wies Maxima bei 568nm, mit je einer Schulter bei 660 und 530nm, sowie bei 380nm auf ($Q_{vis}/UV = 1.4$).

In der anschließenden Chromatographie zu Abtrennung von überschüssigem Thiol etc. erwies sich ein Teil der Produkte als sehr polar und konnte, im Gegensatz zu Phorcabilin-dme (10-20% MeOH in CHCl_3), nur mit reinem Aceton aus dem Kieselgel ausgewaschen werden. Die analytische DC (NP, CHCl_3 /Aceton 8:2) ergab folgende Produktverteilung:

a) blau/ $R_f=0.39$ (identisch zu nicht behandeltem Phorcabilin),
b) gelb/ ≈ 0.2 , c) blau/0.09, d) violett/0.05, e) blau/0.00.

Bei nachfolgender Belichtung zeigten die Fraktionen jedoch keine chromatographischen (zweidim. DC) oder spektralen (mit Ausnahme von Ausbleichen) Änderungen, die auf eine Entstehung von photolabilen Konfigurationsisomeren hinwiesen. Nach 12 Stunden Stehen in Lösung bei -18°C waren neben vielen roten/gelben/violetten Abbauprodukten nur noch Spuren von Phorcabilin-dme nachzuweisen; neben dem polaren blauen Produkt bei $R_f=0$ war ein wesentlich unpolares (blau, 0.89) neu entstanden.

b) Zur Kontrolle wurde Phorcabilin-dme in DMSO ohne Nucleophil wie unter a) beschrieben belichtet und extrahiert. Das Produkt absobierte in CHCl_3 bei 550 und 380nm, in der analytischen DC (NP, CHCl_3 /Aceton 7:3) war neben Phorcabilin-dme ($R_f=0.5$) noch ein unpolares blaues Produkt (0.9), sowie schwache Flecke bei $R_f=0.1$ und 0.02 (rot), bzw. $R_f=0.03$ (blau) nachzuweisen.

c) Wurde Phorcabilin-dme in Chloroform belichtet (45min Weißlicht unter Ar und Wasserkühlung, trotzdem starke Erwärmung), verschob sich das Absorptionsmaximum hypsochrom auf 512, 560nm, 380nm. Dabei wurde erneut das sehr polare, sowie das sehr unpolare blaue Produkt (siehe a und b) neben Phorcabilin-dme und roten Oxidationsprodukten erhalten. Durch Belichtung auf der DC-Platte (zweidim. DC unter Argon) zersetzte sich das unterhalb der LM-Front laufende blaue Pigment in mehrere polare rote Oxidationsprodukte, die restlichen Produkte änderten ihr Laufverhalten nicht.

Bei Belichtungsversuchen von BV IXr-dme in diversen Lösungsmitteln wurden von CHOUSY und BARBIER (1976) neben Phorcabilin- und Sarpodobilin-dme weitere blaue Produkte

gefunden, die im Bereich von 550 bis 600nm absorbierten und sowohl polarer als auch unpolarer gegenüber den gestreckten Pigmenten waren.

Mit Sicherheit konnte Sarpedobilin- dme als Produkt der Belichtung von b) und c) ausgeschlossen werden (siehe Tabelle 9, durch Cochromatographie nachgewiesen). Auch Isophorcabilin- dme entstand nicht unter neutralen Bedingungen in CHCl_3 oder DMSO.

Tabelle 9: Bei der Belichtung von BV IXr- dme (14) in verschiedenen Lösungsmitteln gefundene blaue Pigmente (CHOUSSY und BARBIER, 1976)

Pigment ¹	Abs. ² (λ_{max})	2 Stunden belichtet in			
		MeOH	DMSO	CHCl_3	Benzol
BV IXr- dme	650	++ ³	+	-	++
Pigment τ_2	550	+ ⁴	+	-	-
Pigment τ_3	580	+	+	-	-
Phorcab.- dme	560	+	++	-	-
Pigment τ_5	600	-	-	-	-
Sarpedob.- dme	600	+	-	-	-
Pigment τ_7	600	+	-	-	-

1) gefundene Pigmente (in Reihenfolge zunehmender Polarität)

2) gemessen in MeOH

3) Hauptprodukt

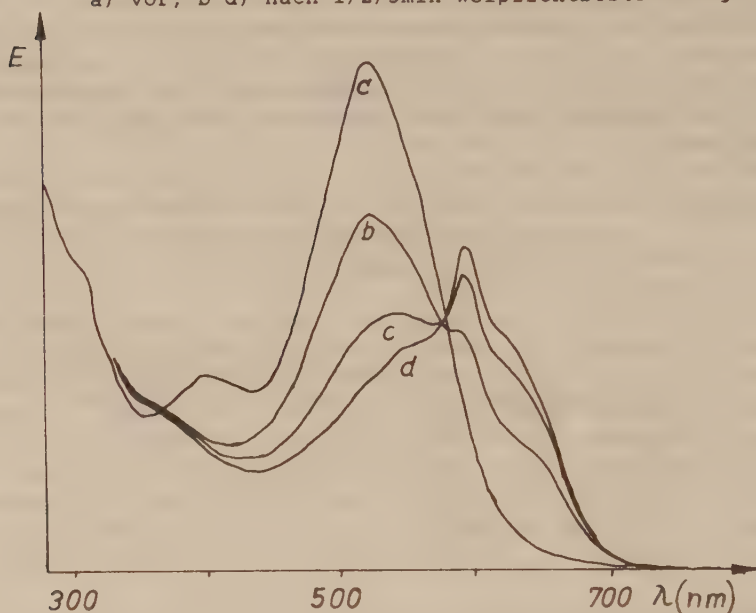
4) Anteil 3 bis 15% maximal

d) Phorcabilin wurde wie unter a) beschrieben mit Mercaptoethanol umgesetzt, das Rubinoid aber länger (ca. 30min) belichtet und die Belichtungsprodukte (analog zu a) extrahiert. Die Säulenchromatographie an KG wurde mit dem polaren Lösungsmittelgemisch von 5 bis 15% MeOH in CHCl_3 durchgeführt, die Fraktionen anschließend auf der analytischen DC (NP, CHCl_3 /Aceton 7:3) untersucht.

Nur die erste Fraktion zeigte noch Spuren von ursprünglich eingesetztem Phorcabilin- dme ($R_f=0.5$).

Fraktion 2/3 enthielt drei rote Produkte bei $R_f=0.2$, 0.3, 0.05 und ein blaues bei $R_f=0.09$; das Absorptionsmaximum in CHCl_3 /MeOH lag bei 523, 400nm. Bei Weißlichtbestrahlung bildete sich bei 594nm (mit Schultern bei 550/630nm) ein neues Maximum aus (Abb. 24). Die DC- Kontrolle zeigte keine Veränderung des blauen Pigments, dafür aber mehrere zusätzliche rote, violette und gelbe Abbauprodukte.

Abb. 24: Absorptionsspektrum der Fraktionen 2/3 aus der Isomerenpräparation (d) in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$:
a) vor, b-d) nach 1/2/3min Weißlichtbestrahlung



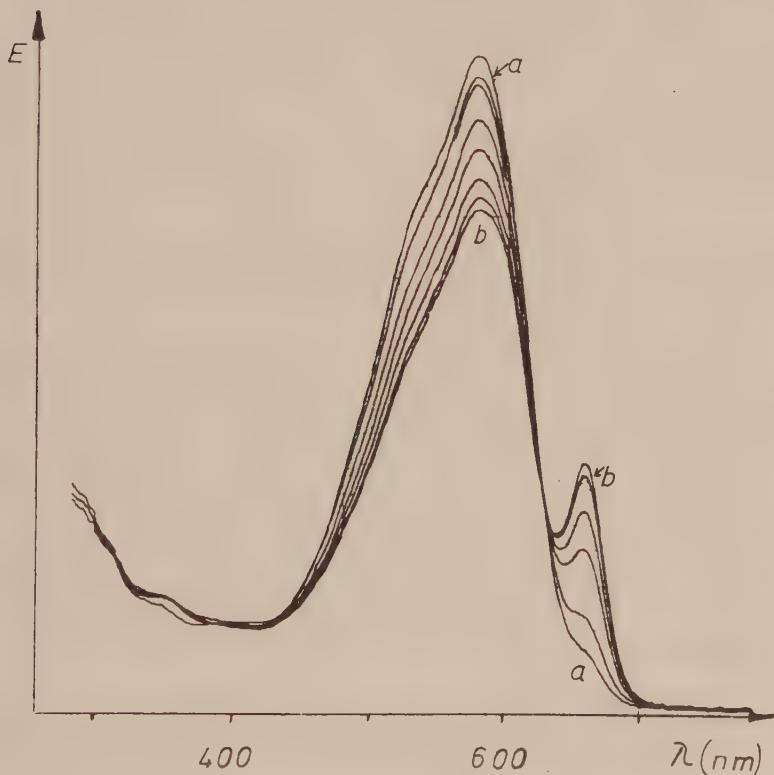
Fraktion 4/5 enthielt neben dem blauen bei (0.09) und roten (0.05), noch ein blaues Produkt bei $R_f=0.04$ und ein violettes bei 0.01. Die Absorption dieses Gemisches in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ lag bei 578, 5660 und 350nm. Bei Belichtung im selben Lösungsmittel ging die Extinktion des Maximums zurück, parallel dazu bildete sich bei 660nm eine neue Bande aus (Abb. 25).

In Fraktion 6 erhielt man ein blaues Hauptprodukt, welches im Laufmittel $\text{CHCl}_3/\text{Aceton}$ nicht lief und mit 10% MeOH in CHCl_3 in zwei Banden bei $R_f=0.039/0.023$ aufspaltete (Phorbacilin- dme: 0.7). Das Absorptionsmaximum und das Verhalten bei Belichtung in Lösung war nahezu identisch zu Fraktion 4/5. In keiner der drei Fraktionen kam es bei Belichtung auf der DC zu Änderungen im Laufverhalten der Pigmente.

Die neue Bande bei 660nm könnte auf die Bildung von Sarpodobilin- dme in diesem Lösungsmittel (mit MeOH; siehe CHOUSSY und BARBIER, 1976 in Tabelle 9) zurückzuführen sein (ev. unter der chromatographischen Nachweisgrenze da sehr dünne Lösungen). Die Reproduzierbarkeit der Vielzahl an farbigen

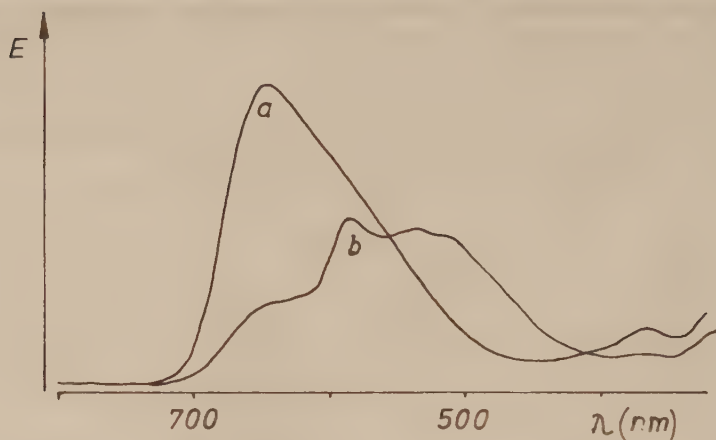
Produkten auf der Basis der analytischen DC war mäßig, da sich die Produkte an der Luft (siehe a) und möglicherweise auch auf der KG- Platte verändern können. Ein Nachweis für das Vorhandensein von Z/E- Konfigurationsisomeren konnte nicht erbracht werden.

Abb. 25: Absorptionsspektrum der Fraktionen 4/5 aus der Isomerenpräparation (d) in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$:
a) vor, b) nach 6min Weißlichtbestrahlung



e) Wurde Phorcabilin- dme in DMSO an der Luft stehen gelassen, blieb das Pigment über eine Stunde unverändert. Dasselbe galt auch für das Kation mit Eisessig. Bei Belichtung des Pigments in saurem Milieu (Abb. 26) ging die Intensität bei 650nm stark zurück, es entstanden neue Banden bei 586, 540 und 520nm. Die analytische DC zeigte nur noch Spuren von Phorcabilin- dme sowie rote/violette Abbauprodukte, aber kein Sarpedo- oder Isophorcabilin- dme.

Abb. 26: Belichtung des Phorcabilin- dme Kations in DMSO/ Eisessig mit Weißlicht: a) vor, b) nach 240sec hv



1.2.2.4 Versuch der Z/E- Isomerisierung beim Isophorcabilin- Dimethylester

Isophorcabilin- dme (18) erwies sich sowohl im festen Zustand (-18°C, dunkel), als auch in Lösung als sehr instabil. Ließ man es in Chloroform über Nacht bei ca. 4°C dunkel stehen, verschob sich das Absorptionsmaximum (Abb. 27) im langwelligen Bereich während dieser Zeit von 608 auf ≈ 620 nm (Plateau), im UV von 362 auf 366 nm. Das Spektrum ließ auf eine partielle Protonierung durch "saures" Chloroform schließen (λ_{max} des Kations mit Tfa: 689, Sh 640 nm). Dabei zersetzte sich das Pigment aber teilweise; in der analytischen DC waren, neben (18), zahlreiche gefärbte polare Abbauprodukte sichtbar.

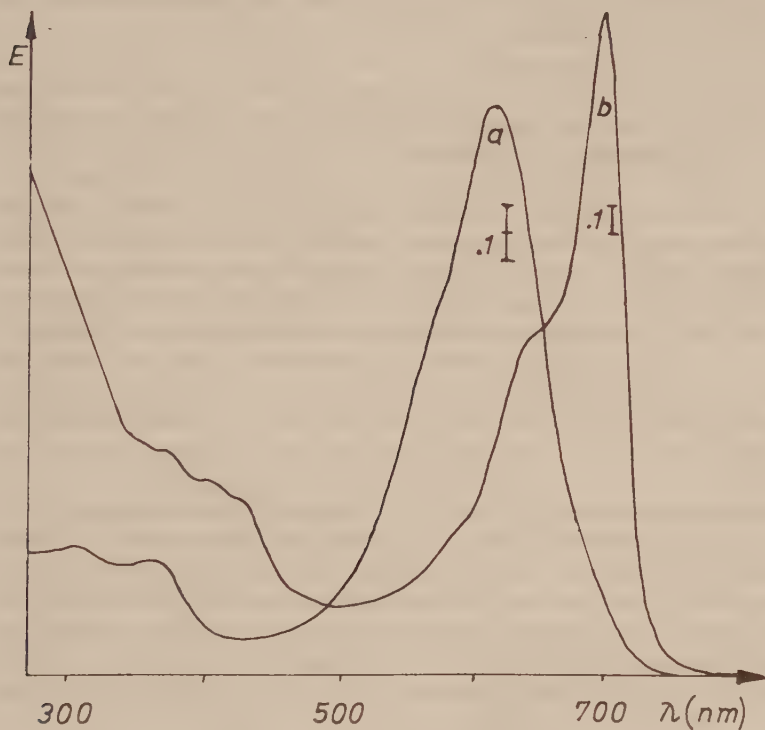
Wurde Isophorcabilin- dme in DMSO aufgenommen, erhielt man eine blaue Lösung mit Maxima bei 649, Sh 610 und 377 nm (Maxima möglicherweise auch hier durch die leichte Protonierbarkeit längerwellig verschoben). Nach Zugabe von ca. 10 Vol. % Mercaptoethanol (unter Argon, Grünlicht) färbte sich die Lösung binnen 10 min gelb ($\lambda_{max}=400$, Sh 420 nm, Restabsorption bei ≈ 620 nm). Durch Weißlichtbestrahlung (10 min unter Argon, Eiskühlung) ging die Extinktion des Rubinoids stark zurück (ca. ein Drittel), ohne ihr Maximum zu verändern. Nach Extraktion mit $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ zeigte das Absorptionsspektrum in Chloroform neben dem Hauptmaximum bei 610 nm mehrere Schultern (704, 515, 450 nm). Im Dünnschichtchromatogramm erschie-

nen neben dem Ausgangsprodukt zahlreiche gelbe, rote und violette Abbauprodukte. Keines dieser Pigmente ließ sich durch Weißlichtbestrahlung (zweidim. DC) in seinem Laufverhalten verändern.

Auch die Belichtung des Verdins in unterschiedlichen Lösungsmitteln (CHCl_3 , MeOH, DMSO) erbrachte nur Abbauprodukte (DC) und starkes Ausbleichen der Lösungen.

Es konnte kein Hinweis auf die Entstehung eines stabilen E-Isomers gefunden werden.

Abb. 27: Isophorcabilin- dme in a) CHCl_3 , b) $\text{CHCl}_3/1\% \text{ Tfa}$



1.3 Fourier Transform- Infrarot Spektroskopie

Durch schwingungsspektroskopische Methoden wie IR oder Raman erhält man im Prinzip eine Fülle von Informationen über Aufbau und Struktur von Molekülen, sowie auch von molekularen Änderungen (z.B. der Konfiguration). Darüberhinaus bietet die Infrarot- Spektroskopie an proteingebundenen Chromophoren auch Informationen über Änderungen am Proteinteil, wie

sie durch Resonanz- Raman oder CARS Spektroskopie nicht erhalten werden können. Zusätzlich ermöglicht sie auch die Messung an photolabilen Substanzen. da der Meßstrahl keine Photoumwandlungen (wie z.B. bei CARS) auslöst.

Über IR- Spektroskopie an Biliproteinchromophoren und Z/E- Isomeren an diesem System ist bisher wenig bekannt. An Bilatrienen- und 2,3- Dihydrobilatrienen- a,b,c wurde sie bisher fast nur an festen Proben (KBr-Presslinge. z.B. FALK et al., 1983a) und nicht in Lösung durchgeführt.

Die Messungen an den Modellchromophoren OEBV/DHOEBV dienten daher als Vorversuche. um die Charakteristika von Z/E- Isomeren allgemein festzulegen.

1.3.1 ZZE/ZZZ- Oktaethylbiliverdin/Dihydrooktaethylbiliverdin als Modellsubstanzen

Fourier- Transform IR- Spektren an OEBV und DHOEBV wurden in einer Reihe von Lösungsmitteln (CDCl_3 , CS_2 , d_4 -THF, CCl_4 , d_6 -DMSO, HMPT, etc.) aufgenommen, die im Bereich zwischen 1700 und 1200 Wellenzahlen über ausreichende Transmission verfügten. In diesem Abschnitt wurden signifikante Änderungen bei einer E/Z- Isomerisation erwartet, wie sie z.B. für die all- trans/13cis- Isomerisierung des Retinals im Photocyclus des Bacteriorhodopsins (SIEBERT, 1984) beobachtet werden können.

Als Fenstermaterial für die IR- Küvetten wurde entweder ZnSe oder CaF_2 verwendet. Das Material muß lösungsmittelstabil sein, transparent im IR- und sichtbaren Wellenlängenbereich (Belichtung der Probe zur Rückisomerisation notwendig) und außerdem einen möglichst kleinen Brechungsindex (Interferenzen) haben: ZnSe läßt nur Licht längerwellig als ca. 450nm passieren. CaF_2 ist hingegen ein farbloses Material mit nur minimalem Brechungsindex.

Die Messungen in Lösung wurden deshalb auch bevorzugt mit CaF_2 - Fenstern durchgeführt. obwohl Spektren nur bis ≥ 1000 Wellenzahlen (cm^{-1}) aufgenommen werden konnten. Mit ZnSe- Fenstern konnte der gesamte IR- Bereich von 500 bis 4500 cm^{-1} abgefahren werden, jedoch führten geringste Unterschiede in der Temperatur, bzw. Erschütterungen bei der Montage der Küvette zu starken Interferenzen (siehe z.B. Abb. 28b), die in einem schlechten Signal- Rausch- Verhältnis resultierten.

Durch Kühlung des Küvettenhalters (Abb. 67, siehe C. 1.4) konnte ein Verdampfen des Lösungsmittels, sowie der Eintritt von Kondenswasser (Wasserlinien auf den Spektren, siehe z.B. Abb. 31a) während der Messung verhindert werden. Zusätzlich wurde der Küvettenraum mit flüssigem Stickstoff gekühlt und somit eine relativ gleichmäßige Temperierung der Probe zwischen (im Mittel) zwei und fünf Grad Celsius erreicht. Die Qualität der Schwingungsspektren konnte, durch Reduzierung der Meßzeiten von drei Minuten (256 scans) auf 21sec (30 scans), verbessert werden (kurze Meßintervalle ergaben eine geringere Anfälligkeit für Interferenzen).

Der lange Lichtweg von rund 50cm von Weißlichtquelle (siehe C. 1.4) zur Probe im Gerät, ebenso wie die Einschränkung des Wellenlängebereiches durch die Lichtabsorption unter 500nm bei Verwendung von ZnSe- Fenstern, machten längere Belichtungszeiten zur quantitativen E/Z- Umwandlung notwendig.

Wurde die Küvette aus dem IR- Gerät herausgenommen und unmittelbar vor die Lichtquelle gehalten (nur bei Wasserkühlung von Küvette und CaF_2 als Fenstermaterial möglich!), war die Rückisomerisierung binnen ca. einer Minute abgeschlossen. Der starke Intensitätsverlust durch den langen Lichtweg konnte hingegen nur durch Belichtungszeiten von drei bis fünf Minuten kompensiert werden. Bei kürzerer Weißlichtbestrahlung kam es nur zu einer partiellen Reversion.

Die größten Unterschiede zwischen ZZE- und ZZZ- Isomeren bei OEBV/DHOEBV lagen im Bereich der Carbonyl- Valenzschwingungen (Amid I- Bande) bei 1690 - 1680 Wz, sowie der $-\text{C}=\text{N}$ - (1690 - 1640 Wz) und $-\text{C}=\text{C}$ - Valenzschwingungen (1640 Wz). Die Banden waren teilweise überlagert und deshalb schwer zuzuordnen bzw. zu identifizieren. Im fingerprint- Bereich unterhalb 1500 Wz (bzw. im erwarteten Bereich um 1200 - 1100 Wz für cis/trans- Isomere) waren die Änderungen nicht sehr ausgeprägt. Die Verschiebungen im Carbonylbereich bei der E/Z- Photoreversion sind auf die Konformationsänderungen und die erhöhte Bereitschaft des ZZZ- Chromophors zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen. Die Stärke der H- Brücken beeinflusst die Lage der $-\text{C}=\text{O}$ und der $-\text{N}-\text{H}$ Schwingungsbanden.

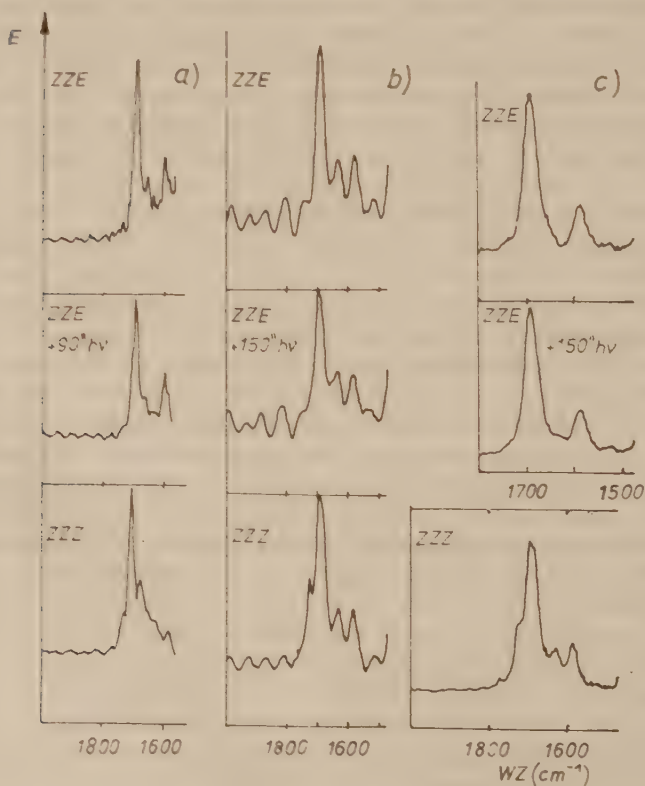
OEBV:

Abb. 28 und 29 sowie Tabelle 10a bis c geben einen Überblick über die Vibrationsspektren von ZZE/ZZZ- OEBV, die in CDCl_3 ,

CH_2Cl_2 , CCl_4 und CS_2 (freie Basen, Kationen) erhalten wurden.

Die intensivste Bande im Spektrum bei beiden Isomeren war die Valenzschwingung der Carbonylgruppe ($-\text{C}=\text{O}$), die je nach Lösungsmittel im Neutralen zwischen 1689 bis 1705 cm^{-1} lag (Abb. 28). Vor allem bei der ZZZ- Verbindung (entstand manchmal auch bei Belichtung von ZZE) hatte diese Bande noch eine kurzwellige Schulter um $1730 - 1720\text{ Wz}$ (Tabelle 10). Ob es sich dabei um eine zweite Carbonylbanden im Molekül (Carbonylgruppen trotz der Symmetrie nicht gleichwertig?), oder nur um einen Aggregationseffekt durch die verwendeten sehr hohen Konzentrationen (2.5 mg pro ml) handelte, konnte nicht geklärt werden.

Abb. 28: Übersicht über die Carbonylregion bei Z/E- Isomeren von OEBV, abhängig von Lösungsmittel und Fenstermaterial: a) CS_2/ZnSe , b) $\text{CDCl}_3/\text{ZnSe}$, c) $\text{CDCl}_3/\text{CaF}_2$



Ebenfalls in diesem Gebiet lag die Valenzschwingung für $-C=N-$ (1690 - 1640 Wz), die vermutlich in der Carbonylbande (sehr breit an der Basis) aufging. Zu sehen ist sie möglicherweise in den Spektren mit CS_2 als Lösungsmittel (die generell sehr reich strukturiert waren; Tabelle 10c, Abb. 28a) bei ca. 1670 - 1660 Wz.

Die Valenzschwingung von konjugierten Doppelbindungen liegt normalerweise in Lösung bei ≈ 1640 Wz; hier könnte ihr die Bande bei ≈ 1630 Wz zugerechnet werden. Absorptionsbanden im Gebiet von 1590 - 1575 Wz, die bei allen Chromophorspektren veränderlich (in ihrer Lage), aber deutlich (Intensität) hervortraten, könnten (zum Teil) den $-N-H$ Deformationsschwingungen (1580 - 1490 Wz) entsprechen.

Eine charakteristische Struktur stellte auch die Doublette (sowohl bei OEBV, als auch bei DHOEBV!) bei 1465 - 1455 Wz (etwas variierend, siehe Tabelle 10, 11. Abb. 29) dar, die von den $-CH_2-$ bzw. $-CH_3$ Deformationsschwingungen stammte und in jedem Isomerisationsstadium, auch im protonierten Zustand, unverändert vorlag.

Abb. 29: IR- Absorptionsspektrum von OEBV in CCl_4 , Fenstermaterial CaF_2 , Scanzahl 30; a) ZZE, b) ZZE + 2min hv, c) ZZZ

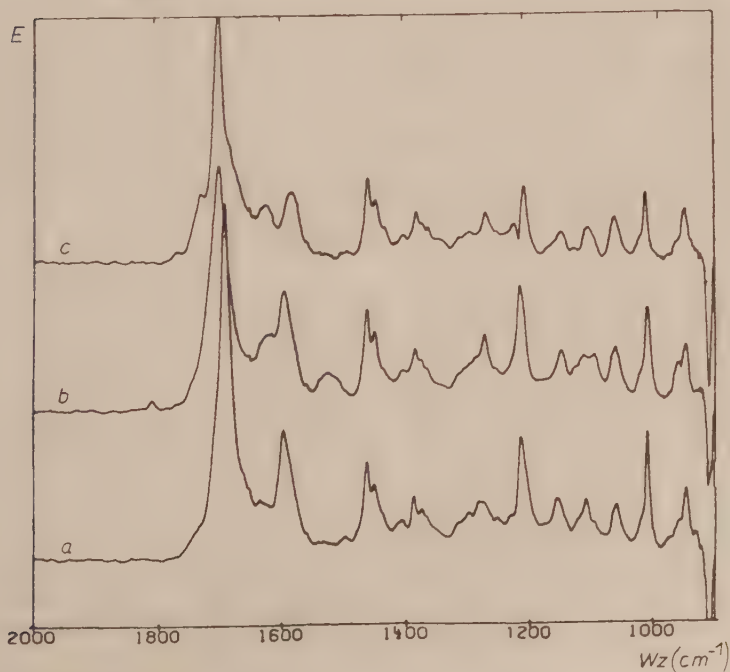


Tabelle 10a: Schwingungsbanden von ZZZ/ZZE- OEBV in Deuterochloroform (freie Base/ Kation)

CDCl ₃ /CaF ₂ (30sc ¹)		CDCl ₃ /ZnSe (30sc/≈2.9C ²)		CDCl ₃ /ZnSe (30sc/≈1.7C)		CDCl ₃ /1% Tfa/ZnSe (30sc/≈2.1C)	
ZZE	ZZE/hv ³ ZZZ	ZZE	ZZE/hv ⁴ ZZZ	ZZE	ZZE/hv ⁵ ZZZ	ZZE	ZZE/hv ⁶ ZZZ
>1691	>1691a 1728 >1692	>1689 >1694a s1722 >1692	>1694a s1722 >1692	s1694 >1689	1724	1739 s1739 s1718 1718 s1670 >1674z	1721 >1671
>1585	s1637z <1629 >1585a >1575	1629 1632 1630 1576 1581 1580	1629 1632 1630 1576 1581 1580	1624 1626 1581 1579	1687 1629 1582	1650 1650z s1620 1622 >1598 >1596a	1649 1624 >1595
<1523	<1523 <1527	s1539 <1540z <1518 <1521 >1508 s1508a	<1540 <1522	1509 1519		s1550 s1526 <1533z <1514 1514	s1526 1526 1513
1466 1466 s1454 s1454	1467 s1455	1462 1465 1463 1453 1452 1450 s1400 s1405 1388 1388	1463 1450 s1405 1385	1463 1463 1450 1450 s1403 s1402 1388 1387	1463 1450 s1404 1382	1469 1469 1450 1450 1395 1392 <1375 1377	1469 1450 1390 <1372
<1342 <1342 s1320 <1320z s1308 <1308	s1348 s1320 s1309	<1339	<1345	1336 1335	<1345 s1330	1319 1319	1315
Lösungsmittel		s1295 1298z s1296 1276 1275a 1274 Lösungsmittel <1174 s1153 <1146z <1150 <1125a s1122 1111 <1112a 1108	s1295 1298z s1296 1276 1275a 1274 Lösungsmittel <1174 s1153 <1146z <1150 <1125a s1122 1111 <1112a 1108	s1295 s1296 s1297 1276 1275 1275 Lösungsmittel s1172 1169z s1166 1155 1153 <1153 s1126z <1128 1112 1109 1108	s1297 1275 Lösungsmittel s1166 1153 1128 1108	Lösungsmittel	
1152 1152 1112 1112	1151 <1128 1109	11174 s1153 <1146z <1150 <1125a s1122 1111 <1112a 1108	<1174 s1153 <1146z <1150 <1125a s1122 1111 <1112a 1108	1060 1062 1060 1010 1013 1010 Lösungsmittel	1060 1060 1059 1012 1011 1010 Lösungsmittel	<1100 <1100 <1100 <1087 <1085 1056 1056 1066 s1044 >1006 >1008 1010 962 963 962 950z 950	<1100 <1085 1066 1010 950
Fenstermaterial undurchlässig							

1) Scanzahl (30sc entsprechen 21sec), 2) Temperatur am Küvettenhalter, 3) 60sec, 4) 60sec, 5) 160sec, 6) 120sec Weißlicht (Bestrahlung im IR- Gerät) (<) schwache, () mittelstarke, (>) intensive Bande, (a) Rückgang, (z) Zunahme der Bandenintensität, (s) Schulter

Tabelle 10b:

Schwingungsbanden
von ZZE/ZZZ- OEBV
in Methylenchlorid
(freie Base/Kation)

CH ₂ Cl ₂ /ZnSe (100sc/≈1C)			CH ₂ Cl ₂ /1% Tfa ZnSe (30sc/≈3.5C)	
ZZE	ZZE/hv ¹	ZZZ	ZZE	ZZE/hv ²
		s1727		
>1694	>1694	>1695	>1681	>1681z
s1650		s1669	s1640	1645z
<1632	<1630	s1626	1632	1626
		s1606		
1581	1582z	1595	>1600	1598a
		<1542	s1566	
s1519	>1513		<1526	<1526
<1509	1500			
1462	1464	1466	1467	1467
s1450	s1450	s1455	s1453	s1453
1419	s1416a	<1410	s1429	s1429
s1406	s1400a			
1389	1390z	<1387	<1395	<1389
		<1367	<1382	s1382
<1339	<1339		s1345	<1345z
		<1316	s1326	s1306
Lösungsmittel				
1216	1216	s1226		
s1203	s1205	1213		
1150	1145z	I		
<1112	s1113	n	<1100	<1100
<1056	s1058	t	1060	1060
1010	1010	e	>1008	>1008
s 976	963z	r	960	s960a
950	950	f. ^a	< 950	< 950

CS ₂ /ZnSe - OEBV (30sc/3.4C)			CS ₂ /ZnSe - DHOEBV (30sc)		
ZZE	ZZE/hv ³	ZZZ	ZZE	ZZE/hv ⁴	ZZZ
		1730	1739	1738	1730
>1689	>1689a	>1701	>1706		
s1662	1676		1685	>1696	>1694
1652	s1652		1658	1656	<1677
<1633	<1639a	s1629	1633	1632	s1656
	<1626		1610	1610	1626
1595	1598	1587	s1589		<1606
Lösungsmittel			Lösungsmittel		
s1316	s1320	s1316	<1321	<1320	<1313
s1295	s1292	s1295	<1286	<1288	<1287
<1281	<1284	<1271	1256	1258	1260
s1256	s1258	<1253	1210	1206	>1213
>1212	>1212	1210	<1179	<1179	<1170
<1175	<1175	<1169	<1158	<1160	s1150
	s1119	<1122		s1124	<1122
<1109	<1109	<1103	<1113	<1108a	<1109
<1056	<1056	1060	<1090	<1089z	<1089
1008	1012	1010	1060	1060	1060
	s 960		1012	1012	1010
< 946	946	948	< 946	< 946	945

Tabelle 10c:

Schwingungsbanden
von ZZE/ZZZ- OEBV/
DHOEBV in Schwe-
felkohlenstoff

- 1) 60sec, 2) 60sec
hv (Belichtung im
IR- Gerät), 3) 80sec,
4) 90sec hv (Belich-
tung im IR- Gerät),
5) Interferenzen,
($\langle$) schwache,
($\rangle$) mittelstarke,
($\gg$) intensive Bande,
(a) Rückgang,
(z) Zunahme der
Bandenintensität,
(s) Schulter

Auch im weiteren fingerprint- Bereich erschienen Banden (abhängig von der Durchlässigkeit des Fenstermaterials und den Transmissionslücken des jeweiligen Lösungsmittels) an vergleichbaren Positionen, die im Detail jedoch bisher nicht exakt Gruppen bzw. Strukturen zugeordnet werden konnten (Tabelle 10a bis c).

Die deutlichsten Änderungen bei der Belichtung der ZZE- Isomere traten im Bereich der -C=N- , -C=C- und -C=O Valenzbanden (1700 - 1500 Wz) auf (Abb. 28,29) und waren abhängig von Lösungsmittel und Belichtungszeit. Um eine quantitative Rückisomerisation sicherzustellen, wurde die Bestrahlung variiert (1 bis 10min), wobei jedoch auch Photooxidationsprozesse (bei Messung in chlorierten Lösungsmitteln, siehe B. 1.1.3.5) nicht völlig ausgeschlossen werden konnten, zumal die Küvettenbauweise eine Messung unter Schutzgas nicht zuließ. Die Bande bei 1810 cm^{-1} , die bei Belichtung von ZZE-OEBV in CCl_4 (Abb. 29) entstand, könnte darauf zurückzuführen sein.

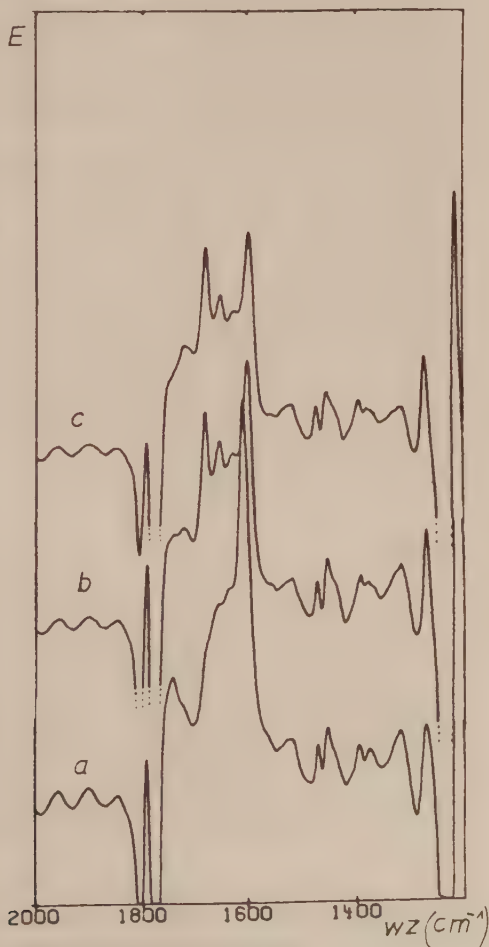
In CH_2Cl_2 (Tab. 10b) konnten nur minimale Änderungen bei Belichtung beobachtet werden (Vergleichsmessungen in CDCl_3 zeigten, daß eine Belichtungszeit von 60sec für eine wenigstens teilweise E/Z- Reversion ausreichte). Vergleichbar dazu waren auch die Messungen in HMPT und d- DMSO (dieses Lösungsmittel hätte sich aus mehreren Gründen angeboten: breite Durchlässigkeit im Bereich von 2000 - 1100 Wz, kein Verdampfen bei langen Meßreihen, löst z.T. auch Proteine, etc.). Die Spektren erschienen jedoch nahezu unstrukturiert mit einer einzigen breiten Bande bei 1665 Wz; das IR- Differenzspektrum von belichtetem minus unbelichtetem ZZE- Isomer wies deshalb auch im gesamten Bereich nur eine Abnahme bei 1688 Wz und die entsprechende (intensitätsgleiche) Zunahme bei 1662 Wz auf, welches einer minimalen Verschiebung an der kurzwelligen Schulter entsprach.

Wurde ZZE- OEBV in CCl_4 zwei Minuten mit Weißlicht bestrahlt (Abb. 29b), verschob sich die Carbonylbande deutlich kürzerwellig von 1694 auf 1705 cm^{-1} , zugleich ging die Intensität der Bande stark zurück. Bei CDCl_3 (falls nicht anders vermerkt siehe erste Spalte der Tabelle 10a) beobachtete man hingegen nur einen Intensitätsrückgang bei unveränderter Bandenlage. Eine ebenfalls deutliche Verschiebung zeigte sich für die -C=C- Schwingungsbande von 1630 nach 1623 cm^{-1} (CCl_4). Bei CDCl_3 entstand im belichteten Chromophor eine

neue Schulter bei 1637 Wz. Die IR- Absorptionsbande bei 1595 cm^{-1} (N-H Deformation) ging leicht zurück ($\text{CCl}_4/\text{CDCl}_3$), ohne sich nennenswert zu verlagern. Eine schwache Bande, die für unbelichtetes und belichtetes ZZE-Isomer in CDCl_3 bei 1523 Wz schon vorhanden war (Abb. 28c), entstand in CCl_4 erst bei Belichtung (1530 cm^{-1} , Abb. 29b). Weitere Änderungen im Gebiet zwischen 1400 und 1000 Wz waren minimal und sehr variabel. Sie konnten nicht exakt lokalisiert werden (CCl_4 : 1300 - 1250 cm^{-1} und 1160 - 1090 cm^{-1} , CDCl_3 : 1550 - 1300 cm^{-1} ; bei Messung in ZnSe- Küvetten auch im Bereich von 1174 bis 1100 Wz. siehe Tabelle 10, Abb. 29).

Abb. 30:

IR- Absorptionsspektrum von OEBV in $\text{CDCl}_3/1\%$ Tfa. Fenstermaterial ZnSe, Scanzahl 30, Temperatur an der Küvette +2.1°C; a) ZZE, b) ZZE + 2min hv, c) ZZZ



Verglich man die Spektren von belichteten ZZE- Isomeren mit denen von ZZZ, so ließen sich Übereinstimmungen, aber auch größere Unterschiede feststellen. In einigen Fällen erschien das Spektrum von ZZZ unbelichtetem ZZE ähnlicher, als dem belichteten ZZE (z.B. CCl_4 : ZZZ- 1530 cm^{-1} Bande fehlt, Schulter bei 1733 Wz nur bei ZZZ, nicht bei belichtetem ZZE).

In diesem Zusammenhang wurde auch ein eventuelles Folge- oder Zwischenprodukt (siehe B. 1.4) während der E/Z- Reversion diskutiert, für das auf diesem Weg jedoch kein Strukturvorschlag gegeben werden konnte. Unter verbesserten Meßbedingungen wurden ZZE- Isomere unmittelbar nach Belichtung, sowie in längeren Zeitintervallen (Stehen im IR- Gerät) danach erneut vermessen, dabei zeigten sich die Spektren unverändert. Keine Abweichungen ergaben auch Blindversuche mit belichtetem ZZZ in den entsprechenden Lösungsmitteln.

Durch Protonierung (1% Trifluoressigsäure) wurde die Bandenstruktur vor allem im Bereich zwischen 1700 und 1600 Wz sehr komplex (Protonierung an N-23). Sowohl in CDCl_3 (Abb. 30, Tabelle 10a), als auch in CH_2Cl_2 (Tabelle 10b) zeigten sich hier deutliche Änderungen zwischen ZZE und belichtetem ZZE. Die Schwingungsbande bei 1598 cm^{-1} wurde bei ZZE zur intensivsten, bei Belichtung ging ihre Intensität unter geringfügiger Verschiebung auf 1596 cm^{-1} stark zurück. Parallel dazu bildete sich bei 1674 cm^{-1} eine deutliche Bande aus. Das durch Weißlichtbestrahlung aus ZZE erhaltene Spektrum war nahezu identisch zu dem des ZZZ.

DHOEBV:

Die IR- Absorptionsspektren des an Ring A hydrierten Chromophors in CDCl_3 , CCl_4 und CS_2 waren generell sehr ähnlich zu OEBV (Tabelle 10c, 11a, c), wiesen aber insbesondere im Carbonylbereich charakteristische Unterschiede auf (zwei Carbonylbanden, siehe Tabelle 11, Abb. 31). Auch eine Probe ohne Lösungsmittel (Film auf ZnSe - Fenster, Abb. 32) zeigte analoge Strukturmerkmale. Die intensivste Bande lag unabhängig vom Isomerisierungszustand des Chromophors bei $1688 - 1685\text{ Wz}$ (CDCl_3).

Durch Deuterierung (Tabelle 11b, c, Abb. 33) wurde die Carbonylbande geringfügig zu kleineren Wellenzahlen hin ver-

schohen (H/D- Austausch an N-21, N-22, N-24), was dafür sprach, daß neben der Beeinflussung der Wasserstoffbrückenbindungen auf $-C=O$, unter anderem auch die N-H Deformations-schwingung mit unter dieser Bande lag.

Die in OEBV nur angedeutete kurzwellige Schulter dieser Bande war bei DHOEBV (vor allem wieder beim ZZZ- Isomer stark ausgeprägt (1723 cm^{-1} , Abb. 31, 32), auch die $-C=C-$ Schwingung ($1635 - 1630\text{ cm}^{-1}$) trat deutlich hervor. Diese beiden Banden wurden ebenfalls durch die Deuterierung beeinflusst.

Tabelle 11a: Schwingungsbanden von ZZZ/ZZE- DHOEBV in Deuteriochloroform (freie Base/Kation)

CDCl ₃ /CaF ₂ (30sc)			CDCl ₃ /ZnSe (30sc/≈3.1C)			CDCl ₃ /1% Tfa/ZnSe (30sc/≈3.1C)		
ZZE	ZZE/hv ¹	ZZZ	ZZE	ZZE/hv ²	ZZZ	ZZE	ZZE/hv ³	ZZZ
s1723	s1723	1725	s1716	s1716z	1720	s1718	<1710z	1708
>1688	1688a	>1687	>1685	>1703a	>1681	s1700		s1689
							1653a	>1655
1637	1632z	>1635	1631	1630	1628	1644	1632a	s1637
								s1626
						>1600	>1600a	1600
1588	1590	1587	>1595	>1598	1589			s1585
	<1540z	<1530	1542	1544	s1540	1542	1547z	1545
		<1510	<1519	1516z	1512	1519	s1521a	1513
			s1495		s1495			
1465	1465	1465	1463	1464	1464	1471	1472	1466
s1453	s1453	s1453	s1450	s1453	s1450	1451	1450	1450
<1410	s1409	<1410	<1409	s1400z	<1410			
		s1393					s1395	s1392
<1385	s1385z	<1385		1388z	<1380	s1389		<1380
s1374	s1374	s1376	<1376			<1378	s1375	
s1363	s1363	s1363			<1363	s1350	s1350	s1348
			1335	<1333				
1323	1318	1321	1319	<1316a	1319	1320	1324	<1313
Lösungsmittel			Lösungsmittel			Lösungsmittel		
Fenstermaterial			s1195	s1185	<1179			
undurchlässig			<1150	1150z	<1153			
			s1138	1138	s1122			
			s1113		<1106			
			1100	1102	<1094			
			1060	1060	1062	1060	1060	1058
			>1005	<1009	1010	>1006	>1006a	>1010
						s 979		
			s 960	< 969z	<1966	960	962a	962
			< 947	< 950				950

1) 10min, 2) 90sec, 3) 90sec Weißlicht (Belichtung im IR-Gerät), (<) schwache, () mittelstarke, (>) intensive Bande.
(a) Rückgang, (z) Zunahme der Bandenintensität, (s) Schulter

CDCl ₃ /CaF ₂ (32sc/9.4C)			CDCl ₃ /D ₂ O/CaF ₂ (32sc/8C)		
ZZE	ZZE/hv ¹	ZZZ	ZZE	ZZE/hv ²	ZZZ
s1721	s1721	1724	s1712	1712z	1720
>1685	>1688a	>1685	>1681	>1681a	>1681
1634	1630	1634	1629	1630z	1627
1592	1595	1587	1592	1591	1587
s1540	1542z	s1538	s1540	<1543z	1528
1464	1463	1465	1462	1462	1462
s1453	s1453	s1453	s1454	s1453	s1453
<1411	<1410	<1410			
<1383	s1384	s1387			
1377	<1377	<1376	<1376		
s1365	s1365	s1365	s1365	s1365	s1365
1319	1315	1315	1315	1312	1312

Tabelle 11b:

Deuterierung von
ZZZ/ZZE- DHOEBV
in Deuteriochloroform

- 1) 5min, 2) 5min (hv im IR- Gerät),
(<) schwache,
() mittelstarke,
(>) intensive Bande.
(a) Rückgang,
(z) Zunahme der Bandenintensität
(s) Schulter

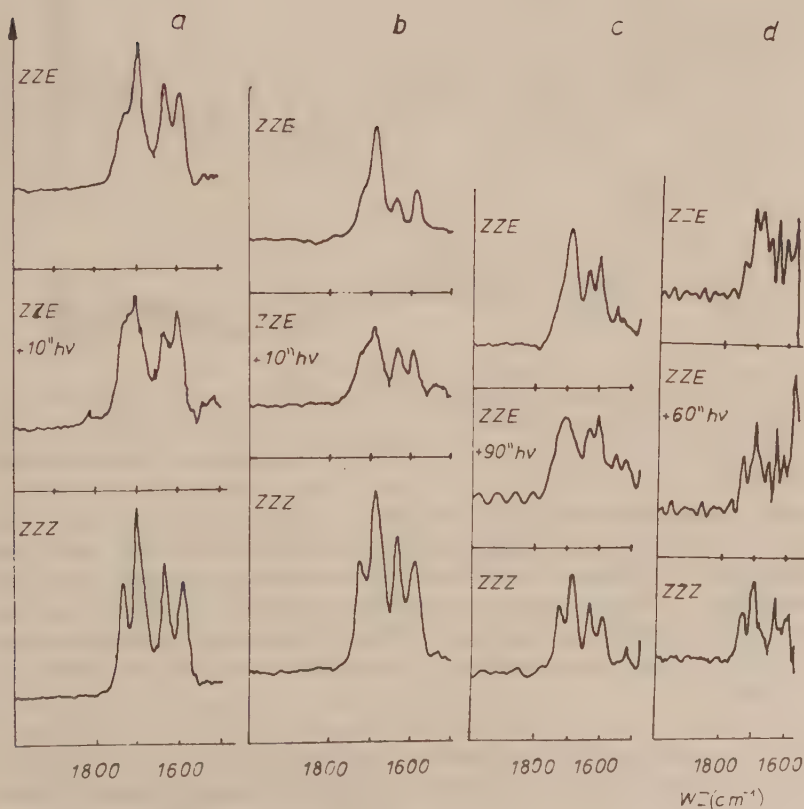
Tabelle 11c: Deuterierung von ZZZ/ZZE- DHOEBV in CCl₄

CCl ₄ /CaF ₂ (30sc)				CCl ₄ /D ₂ O/CaF ₂ (32sc/13C)				CCl ₄ /D ₂ O/CaF ₂ (32sc/6C)			
ZZE	ZZE/hv ¹	ZZE/hv ²	ZZZ	ZZE	ZZE ³	ZZE/hv ⁴		ZZE ⁵	ZZE/hv ⁶	ZZZ	
	<1810	<1810z									
s1733	1733z	s1733	1733	s1733	s1733			s1735	s1752z	1734	
>1697	>1698a	1698a	>1700	>1700		>1710		>1702	1703a	>1694	
		s1687		s1685z							
1630	1630	1630a	1630	1626	1626	s1613		<1631	<1630	1631	
1590	1592	1597	1590	1590	1590	1595		1586	1596	1585	
		s1534				s1523					
		s1510									
1465	1465	1465	1465	1463	1463	1464		1464	1465	1465	
s1453	s1453	s1453	s1453	s1452	s1452	s1454		s1454	s1452	s1453	
				1432	1432						
<1413	<1413	<1413a	<1413	<1405	<1405	1420z		1414	s1410a	<1414	
		s1390	s1394								
<1378	1380		<1380	s1382	1382z	1384z		<1383	<1384z	<1394	
s1366	s1365		s1365	1376	1376			<1373		<1377	
1320	1315	<1315a	1315	1315	1317	s1312		1319	1312a	1314	
<1270	<1270	1270	1270	1276	1276	1274		1280	1275	1272	
s1185	s1185	s1185	1175								
1154	1154	<1154	<1154								
1118	<1123a	<1123	<1123								
	<1108a	s1108	<1108								
<1095	<1092z	<1092	<1095								

- 1) 10min, 4) 5min, 6) 5min Weißlicht (Belichtung im IR- Gerät), 2) 10min Weißlicht + 1min (Küvette unmittelbar vor Lichtquelle gehalten), 3) Probe 20min dunkel stehen (≈10C), 5) Deuterierung über Nacht (≈10C) (<) schwache, () mittelstarke, (>) intensive Bande, (a) Rückgang, (z) Zunahme der Bandenintensität, (s) Schulter

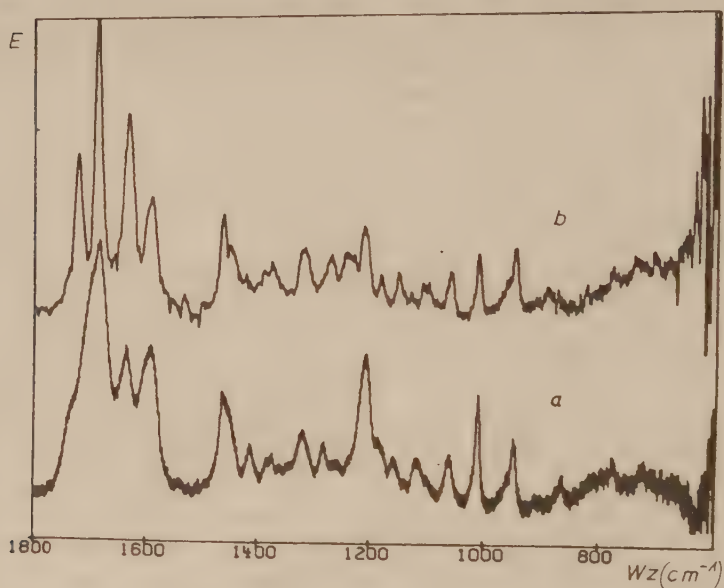
Bei Belichtung von ZZE- DHOEBV zeigte sich ebenfalls ein starker Intensitätsrückgang der (in ihrer Lage unverändert bleibenden) Carbonylbande, dadurch trat die Schulter bei 1721 cm^{-1} deutlicher hervor (Abb. 31, 33). Das Differenzspektrum von belichtetem minus unbelichtetem Chromophor (Abb. 35) wies daneben auch kleine Veränderungen bei 1578 Wz und im Bereich von $1420 - 1300\text{ cm}^{-1}$ analog zu OEBV auf. Im belichteten ZZE- Isomer (CDCl_3) trat im Bereich von 1540 Wz eine neue kleine, eventuell zusammengesetzte Bande auf, die ebenfalls im ZZZ- Spektrum zu finden war.

Abb. 31: Übersicht über die Carbonylregion bei Z/E- Isomeren von DHOEBV, abhängig von Lösungsmittel und Fenstermaterial: a) $\text{CDCl}_3/\text{CaF}_2$, b) $\text{CDCl}_3/\text{ZnSe}$, c) $\text{CCl}_4/\text{CaF}_2$, d) CS_2/ZnSe



Wurde ZZE- DHOEBV in CCl_4 ausgedehnt belichtet, so waren (analog zu OEBV) wiederum Änderungen am belichteten Spektrum festzustellen, die weder in unbelichtetem ZZE noch bei ZZZ auftraten (z.B. Bande bei 1810 cm^{-1} , diverse Intensitätsänderungen, siehe Tabelle 11c). Da CCl_4 dazu neigt, im Licht Radikale zu bilden, können leichte Schädigungen des empfindlichen Dihydrochromophors bei längeren Belichtungszeiten nicht ausgeschlossen werden.

Abb. 32: IR- Absorptionsspektrum von DHOEBV in trockenem Zustand, ZnSe, Scanzahl 64; a) ZZE, b) ZZZ

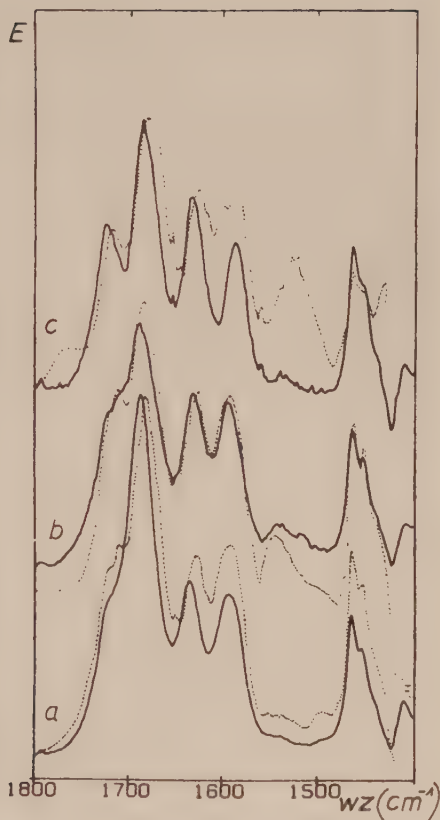


Eine ähnliche Tendenz wie bei OEBV war auch im protonierten Zustand bei DHOEBV zu beobachten (Abb. 34). Die 1644 cm^{-1} Bande spaltete sich bei Belichtung auf in Banden bei 1653 und 1632 cm^{-1} . Die vormals intensivste Linie bei 1600 Wz ging stark zurück, ohne sich zu verschieben. Daneben kam es zu leichten Änderungen im Bereich von ≈ 1550 bis 1520 Wz , dabei wurde jedoch auch eine größere Ähnlichkeit zwischen ZZE und ZZZ, als zwischen belichtetem ZZE und ZZZ festgestellt (siehe B. 1.4).

Die Interpretation der Spektren in den protonierten Verbindungen (OEBV/DHOEBV) gestalteten sich problematisch, weil Tfa im Bereich von $1700 - 1600\text{ Wz}$ ebenfalls Schwingungsban-

Abb. 33:

IR- Absorptionsspektrum von
DHOEBV in CDCl_3 (—) und
 $\text{CDCl}_3/\text{D}_2\text{O}$ (.....),
Fenstermaterial CaF_2 ,
Skanzahl 32,
Temperatur an der
Küvette $\approx 6^\circ\text{C}$,
a) ZZE,
b) ZZE + 5min hv,
c) ZZZ

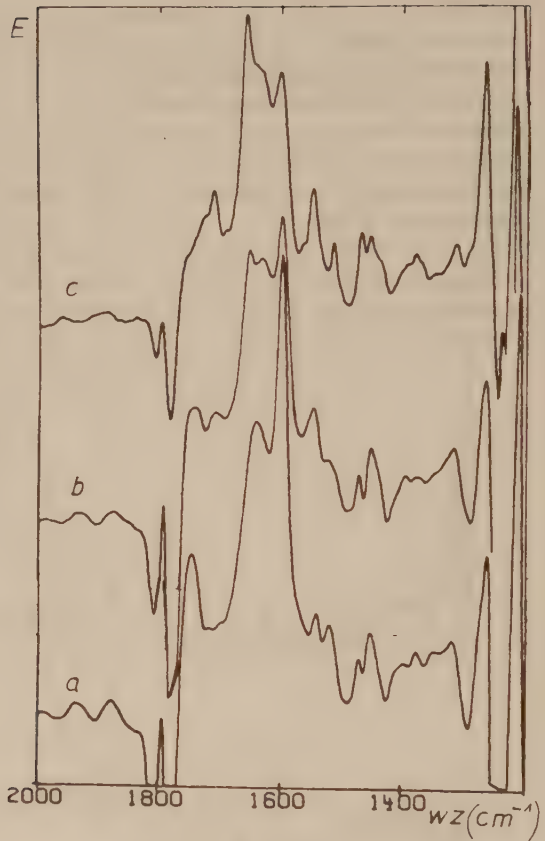


den aufweist, geringfügige Abweichungen im Mischungsverhältnis sich also im Chromophorspektrum (Differenz zum LM) niederschlagen können.

Die deutlichen Änderungen, die nur bei Belichtung auftraten, und die identischen Spektren von ZZZ und ZZE/hv in diesem Bereich, sprachen jedoch dafür, daß es sich bei den beobachteten Banden um echte Molekülschwingungen der Chromophore handelte. Die Versuche, DHOEBV in saurem Ether (HCl) zu protonierten waren zwar erfolgreich (siehe B. 1.1.3.6), zur Messung eines IR-Spektrums mußte der Ether aber (da undurchlässig für IR- Licht) abgeblasen und durch ein anderes Lösungsmittel (z.B. CDCl_3) ersetzt werden. Danach erhielt man jedoch erneut die Schwingungsbanden der freien Base in Deuterochloroform.

Abb. 34:

IR- Absorptionsspek-
trum von DHOEBV in
 CDCl_3 /1% Tfa,
Fenstermaterial CaF_2 ,
Scanzahl 30.
Temperatur an Küvette
+2.5C;
a) ZZE,
b) ZZE + 90sec hv.
c) ZZZ



1.3.2 Infrarot- Differenz beim Phytochromsystem (P_r/P_{fr})

Im Rahmen von Vorversuchen zu dieser Arbeit wurden von RÜDIGER und SIEBERT (1983) erste FT- IR- Messungen zur Aufklärung der reversiblen Photochemie im Phytochromsystem an degradiertem (60Kd) Phytochrom durchgeführt (Abb. 36). Da sich der größte Teil des Apoproteins während der Isomerisation nicht verändert und seine Schwingungsbanden zudem die des Chromophors nahezu völlig überdecken, konnten Änderungen (vor allem am Chromophor) nur in Differenzspektren (P_r minus P_{fr} , P_{fr} minus P_r) erkannt werden.

Die Entwicklung einer verbesserten Präparationsmethode von Phytochrom aus etiolierten Haferkeimlingen (GRIMM und RÜDIGER, 1986), lieferte hochgereinigtes, natives (124Kd), stabiles Chromoprotein. Die daran durchgeführten IR- Differenz-

Abb. 35: IR- Differenzspektrum der E/Z- Isomerisierung von DHOEBV in CDCl_3 , Fenstermaterial CaF_2 , Scanzahl 30, Temperatur an Küvette $+10^\circ\text{C}$; ZZE + 5min hv minus ZZE unbelichtet

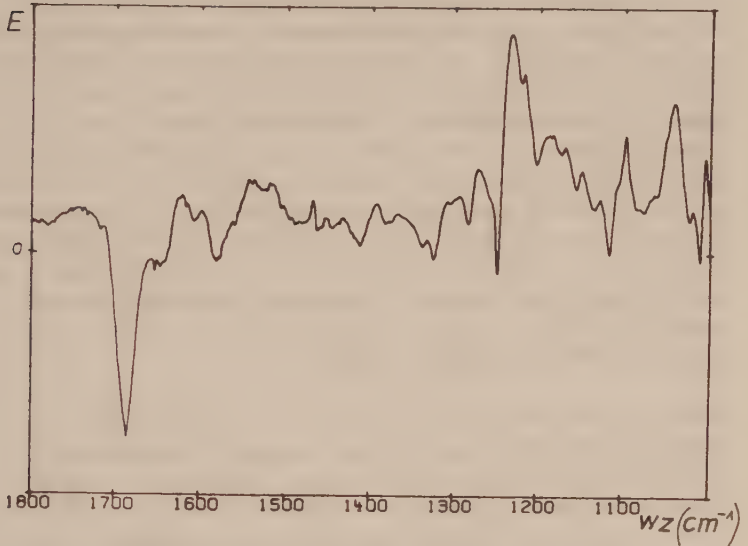
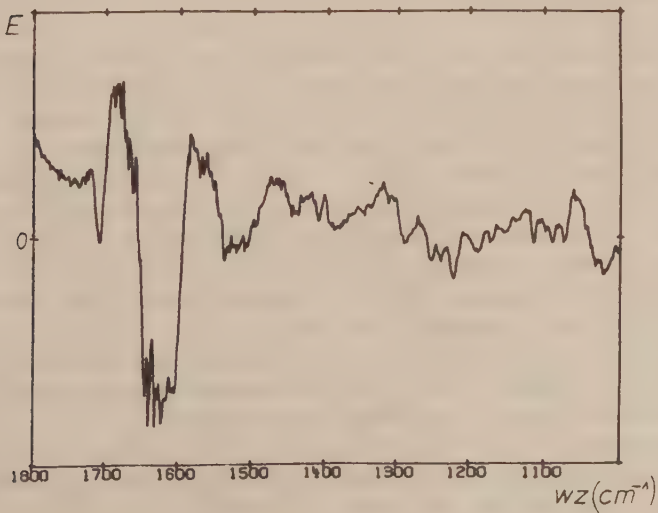


Abb. 36: IR- Differenzspektrum der Isomerisierung von Pr nach P_{fr} (60kD- Phytochrom) in H_2O / 0.25% Glycerin (eingeengt zu Film auf dem Fenster, siehe Text); P_{fr} (5min 664nm- Bestrahlung) minus Pr



messungen reproduzierten die Ergebnisse, die sich schon in den früheren Messungen mit kleinem Phytochrom ergeben hatten. Sie zeigten deutliche Änderungen bei den Schwingungsbanden, die die reversible Photoumwandlung als eine cis/trans- Isomerisierung des Chromophors erklären (Abb. 37/38). Die Messungen an proteingebundenen Chromophoren wurden in denselben Küvetten wie für Modellchromophore OEBV und DHOEBV durchgeführt. Phytochrom (in H_2O) wurde unter den neuen verbesserten Meßbedingungen (gegenüber 1983!) mit 0.3 Vol.% Glycerin gemischt und 200 μ l davon in einem leichten Stickstoffstrom auf ein ZnSe- Fenster aufgetrocknet. Das Gegenfenster bestand aus, für sichtbares Licht undurchlässigem, Germanium. Es stellte sich heraus, daß die Photoreaktion sowohl von P_r nach P_{fr} als auch von P_{fr} nach P_r nicht im reinem Glycerinfilm ablief, sondern Spuren von Wasser (Anhauchen der Probe genügte) dazu notwendig waren (siehe dazu auch KENDRICK und deKOK, 1983).

Die Photoumwandlung von P_r nach P_{fr} (entspricht ZZZ zu ZZE) wurde durch Bestrahlung mit 5min Hellrot (664nm) bei 60kD und 124kD Phytochrom erreicht. Es ergaben sich vergleichbare Änderungen über den gesamten Carbonyl- und fingerprint- Bereich zwischen 1700 und 800 Wellenzahlen (Abb. 36/37). Entsprechend der voll reversiblen cis/trans- Konfigurationsänderung des Chromophors im nativen Phytochrom war die Rückreaktion von P_{fr} nach P_r (ZZE nach ZZZ) mit 20min Dunkelrot (730nm, Abb. 38) spiegelbildlich zum IR- Differenzspektrum der Hinreaktion (Abb. 37).

Vergleichbar mit den IR- Messungen der E/Z- Isomerisierung an den Modellchromophoren (Abb. 35) waren die intensivsten Differenzbanden in der Carbonylregion zu beobachten, die die unterschiedlichen Einflüsse von Wasserstoffbrücken auf die Stereoisomere verdeutlicht. Die Z/E- Isomerisierung (Abb. 37), die bei OEBV/DHOEBV nicht auf direktem Weg über das Verdin durchgeführt werden kann (siehe Schema 3) zeigte z.B. eine negative Bande bei 1707 cm^{-1} (bei den Modellbilinen nur im ZZZ- Chromophor deutlich ausgebildet). Der Abnahme bei 1644/1603 Wz / Zunahme bei 1622 Wz in Phytochrom (Abb. 37, P_{fr} minus P_r) entsprach die Abnahme bei 1685 Wz / Zunahme 1620 Wz in DHOEBV (Abb. 35, Differenzspektrum zwischen belichtetem und unbelichtetem ZZE- DHOEBV).

Daraus ließ sich jedoch auch eine deutliche längerwellige Verschiebung der Schwingungsbanden im proteingebundenen gegenüberdem freien Chromophor erkennen.

Abb. 37: IR- Differenzspektrum der Isomerisierung von P_r nach P_{fr} (124kD- Phytochrom) in $H_2O/ 0.3\%$ Glycerin (eingengt zu Film auf dem Fenster, siehe Text): P_r minus P_{fr} (5min 664nm- Bestrahlung)

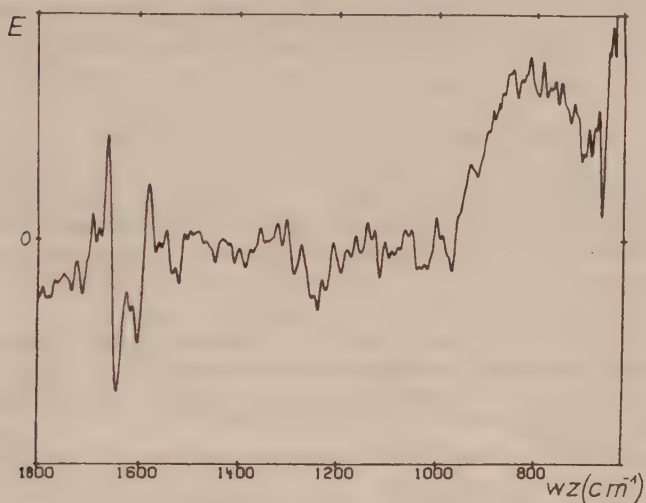
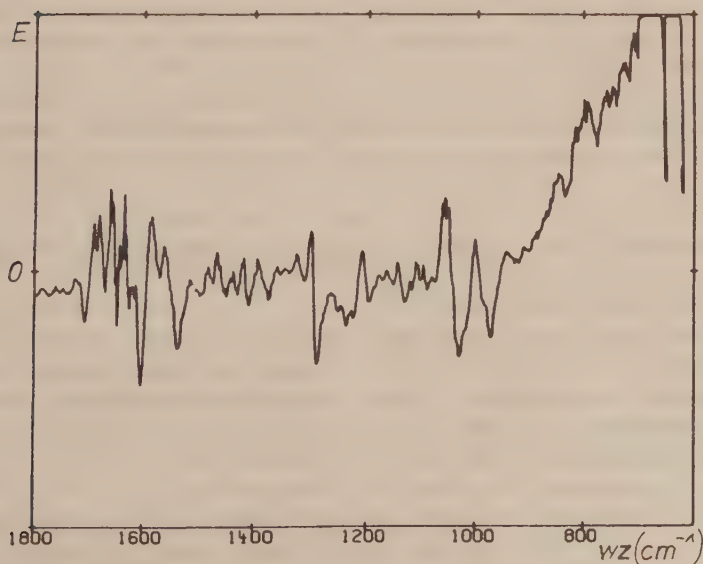


Abb. 38: IR- Differenzspektrum der Isomerisierung von P_{fr} nach P_r (124kD- Phytochrom) in $H_2O/ 0.3\%$ Glycerin (eingengt zu Film auf dem Fenster, siehe Text): P_{fr} minus P_r (20min 730nm- Bestrahlung)



Auch im weiteren Verlauf der Phytochromdifferenzspektren (in P_r/P_{fr} fast gegenläufig zu P_{fr}/P_r) traten Übereinstimmungen in den Strukturen zu DHOEBV auf. Die Änderungen in den Vibrationsbanden bei Phytochrom erschienen jedoch viel ausgeprägter und konnten vor allem reproduzierbar und auch nach wiederholten Hin-/ Rückbelichtungszyklen beobachtet werden.

1.3.3 Schwingungsspektroskopie bei Phycocyanin

Als Verbindungsglied zwischen cis/trans- konfigurierten freien Modellchromophoren wie OEBV und DHOEBV und dem photo-reversiblen Phytochromzyklus sollte auch Phycocyanin mit modifizierten (d.h. Z/E- isomerisierten) Chromophoren (siehe B. 2.2) IR- spektroskopisch untersucht werden.

Erste Ergebnisse aus anderen schwingungsspektroskopischen Methoden (Resonanz- Raman: SZALONTAI et al., 1987; CARS: SCHNEIDER, 1987; SCHNEIDER et al., 1988) sollten dazu verglichen werden.

Die Aufnahme von IR- Differenzspektren von PC zu PC mit modifizierten Chromophoren ergab bisher jedoch keinen Aufschluß über die spektralen Änderungen bei der E/Z- Isomerisierung des Chromophors, wie sie vergleichsweise bei Phytochrom erhalten wurden. Durch Belichtung des PC- Films (gleiche Arbeitsbedingungen wie bei P_r/P_{fr} , siehe B. 1.3.2) konnte keine sichtbare Änderung im Spektrums erzeugt werden. Dies deutete darauf hin, daß die E- konfigurierten Chromophore im nativen Phycocyanin (im Vergleich zu Phytochrom) entweder erheblich instabiler gegenüber Dehydratisierung reagierten (siehe B. 2.2.3.2) und deshalb beim Antrocknen sofort zu ZZZ reversionierten, oder im Gegenteil, unter den gewählten Bedingungen gegenüber Licht stabilisiert wurden.

1.4 Existenz eines Zwischenproduktes bei der ZZE/ZZZ- Photo-reversion

Die Frage nach eventuell existierenden Zwischen- oder Folgeprodukten (Z^*) stellte sich im Laufe der Arbeiten an OEBV und DHOEBV mehrere Male. Auch im Phytochrom bildet ja die Z/E- Photokonversion nur den ersten Schritt im gesamten Photozyklus (Übersicht bei RÜDIGER, 1980).

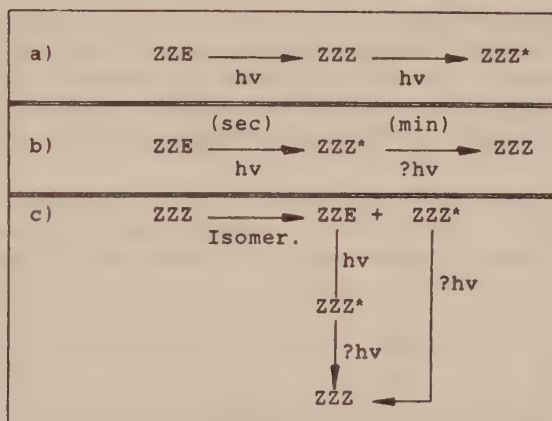
Bei der Aufnahme der IR- Spektren (siehe B. 1.3.1) wiesen die Banden der ZZZ- Isomere mehr Ähnlichkeit mit denen des

ursprünglichen ZZE-, als mit dem belichteten Stereoisomeren auf (beide Isomere aus der präparativen Photoumwandlung, siehe B. 1.1.2). Es wäre möglich, daß das sättigend belichtete E- Isomere zuerst eine instabile Zwischenstufe Z* bildet und erst nach längerer Relaxationszeit in das endgültige Z- Stadium übergeht (Schema 7b). Diese Zeitspanne konnte aber nie ermittelt werden (keine Änderung des Spektrums auch nach längeren Wartezeiten, d.h. 15 bis 30min).

Diesbezüglich durchgeführte kinetische UV- Vis- Absorptionsdifferenzmessungen ergaben keine Unterschiede zwischen unmittelbar belichtetem ZZE- OEBV und belichtetem, länger bei Dunkelheit unberührt stehendem, Reversionsprodukt.

Schema 7:

Mögliche Wege
für die
Entstehung
von Zwischen-/
Folgeprodukten
bei der E/Z-
Isomerisierung



Bei den ^1H - NMR Messungen (siehe B. 1.1.5) fiel auf, daß belichtetes ZZE und belichtetes ZZZ vergleichbare Signalverschiebungen bzw. Banden aufwiesen. Dies würde dafür sprechen, daß ZZE nach Photoreversion zu ZZZ weiter in ein Folgeprodukt Z* umgewandelt wird (Schema 7a), welches auch durch unmittelbare Belichtung von ZZZ entsteht.

Das Produkt blieb stabil (z.B. 24 Stunden kühl und dunkel), durch Zugabe von D_2O konnten jedoch die ursprünglichen ZZZ- Methinsignale zurückerhalten werden.

(Diese Beobachtungen konnten jedoch nur bei der Verwendung von CDCl_3 als Lösungsmittel gemacht werden. Untersuchungen an ZZZ- OEBV/-DHOEBV in Chloroform ließen jedoch eher Abbaureaktionen in Zusammenhang mit der zur Rückisomerisierung verwendeten Lichtquelle vermuten, siehe B. 1.1.3.5).

Im Rahmen der E/Z- Umwandlung bei Biliverdinen in verschiedenen Lösungsmitteln fiel ebenfalls auf, daß in manchen Fällen, trotz sättigender Belichtung, die exakte Absorptionswellenlänge des unbelichteten ZZZ- Isomers (aus der Präparation, B. 1.1.2) nicht erreicht wurde (Abweichungen um zwei bis drei nm!). Trotzdem ergab der chromatographische Vergleich immer identische Rf-Werte für ZZZ und belichtetes ZZE (siehe B. 1.1.3.2).

Eine weitere Möglichkeit wäre auch (Schema 7c), daß das bei der Photoisomerisierung über den Rubinoidweg isolierte ZZZ*-OEBV nicht mehr "identisch" ist zu OEBV aus der Oktaethylporphyrinspaltung (siehe B. 1.1.1). Dies würde die chromatographische Identität von ZZZ- und belichtetem ZZE-Isomeren erklären.

Unterstützen würden diese Theorie wiederum geringe Absorptionsunterschiede zwischen den beiden ZZZ- Chromophoren, die jedoch auch auf der Tatsache beruhen könnten, daß das Ausgangsprodukt kristallisiert und damit hochgereinigt war gegenüber dem ZZZ aus der Isomerentrennung.

Zusammenfassend gesehen bleibt auch die Möglichkeit offen, daß es sich bei dem präparierten ZZE- Isomeren nicht um ein "echtes" Stereoisomer, sondern erneut bereits um ein verändertes Produkt handelt, das bei Belichtung entsprechend ZZZ* ergibt.

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, daß ZZZ* als Folge- bzw. Zwischenprodukt bei der Belichtung von Z und E-konfigurierten Chromophoren auftritt, wobei sich, abhängig von den Reaktionsbedingungen und der Umgebung, ein "Gleichgewicht" zwischen ZZZ und ZZZ* einstellen kann.

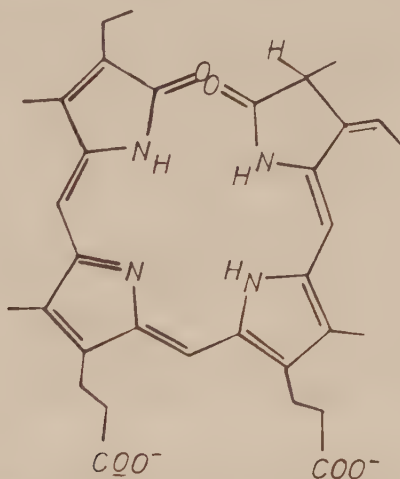
2. Cis/Trans- Isomerisierung proteingebundener Tetrapyrrochromophore

Um eine Überleitung zur Primärreaktion im Photozyclus der Chromophore des Phytochroms zu erhalten, wurde die Photochemie eines Biliproteins mit strukturell sehr ähnlichen Chromophoren untersucht.

Die problemlose und leichte Addition von Mercaptoethanol an Chromophore vom Bilatrien- a,b,c- (5) und dem zu PC und Phytochrom (3) vergleichbaren 2,3- Dihydrobilatrien- a,b,c Typ (6), die gute Ausbeute an Photoisomerisationsprodukten durch

Belichtung im rubinoiden Zustand, sowie deren Rückgewinnung im Verdinzustand durch Eliminierung des Thiols mittels $H_2O/Säure$, sollte auch auf integrales PC sowie seine α - und β - Untereinheiten übertragbar sein. Dazu wurde zuerst versucht, bei enzymatisch abgebautem Phycocyanin Konfigurationsisomere zu präparieren. Der Chromophor (3b) bleibt dabei, im Gegensatz zu Phycocyanobilin (19), kovalent an die Aminosäure Cystein gebunden.

(19) Phycocyanobilin



2.1 Konfigurationsisomere bei Phycocyanin- Peptiden

PC -Peptide von Mastigocladus laminosus wurden durch Abbau des Proteins mit Pepsin im sauren Milieu erhalten (siehe C. 2.1.9.3, Abb. 39)). Nach Abtrennung von farblosen Proteinbruchstücken über ein Molekularsieb in wässriger Ameisensäure, wurden die blauen Chromopeptide neutralisiert und in Lösung eingefroren oder lyophilisiert.

Das Absorptionsmaximum der Peptide ähnelte dem des Dihydro-oktaethylbiliverdins und war ebenfalls stark vom pH- Wert der Umgebung abhängig. In wässriger Ameisensäure (pH=1) lag es rotverschoben bei 634nm gegenüber dem Neutralen (593nm), das Anion (pH=12) zeigte neben einem Maximum bei ca. 600nm noch eine Schulter bei 756nm (Abb. 40). Die Extinktion des Kations im sichtbaren Wellenlängenbereich stieg gegenüber der freien Base an. Q_{vis}/UV betrug 0.77 bzw. 0.36 im Neutralen. Die Stabilität der Peptide in Lösung war im stark Sauren deutlich erhöht gegenüber neutraler oder basischer Umgebung (Abb. 41).

Abb. 39: Lyophilisiertes PC gelöst in a) destilliertem H_2O ,
b) nach 60min Pepsinabbau bei $pH=1.7$

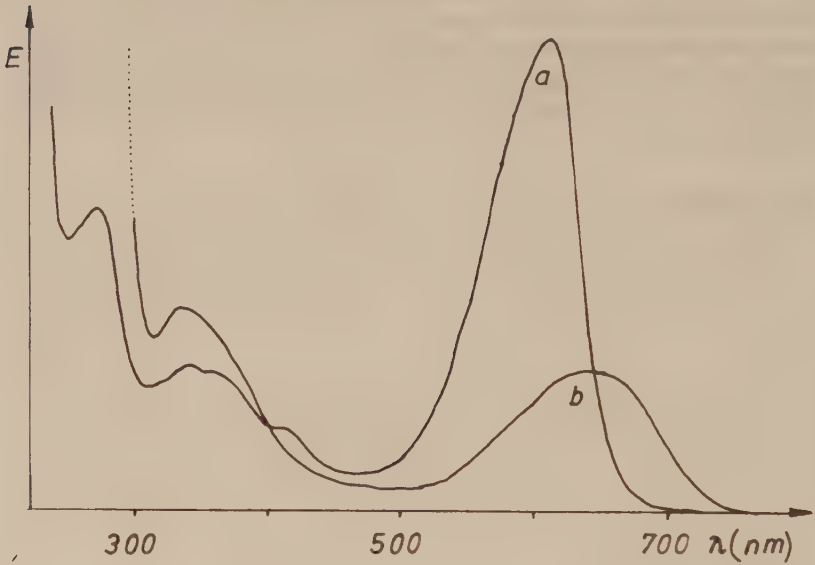


Abb. 40:

Abhängigkeit der Absorptionswellenlänge eines PC-Chromopeptidgemischs vom pH-Wert der Lösung

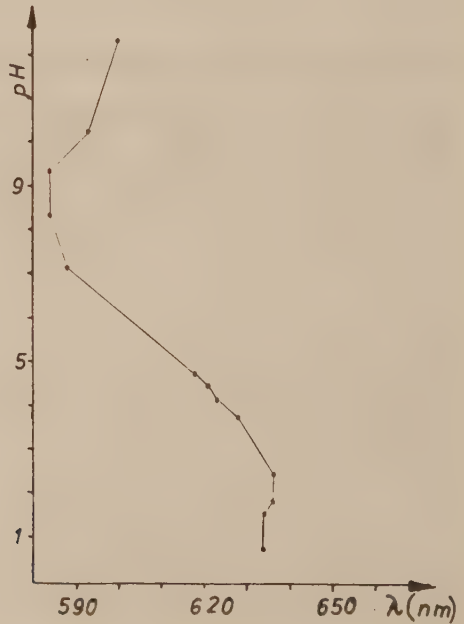
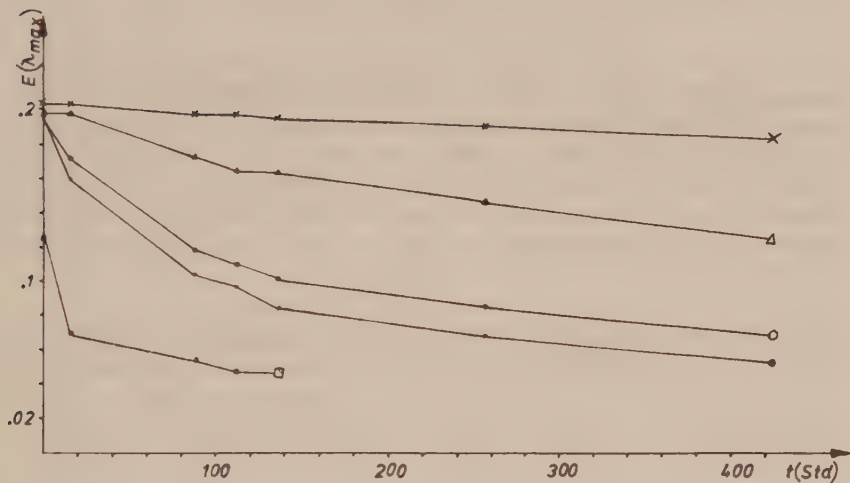


Abb. 41: Stabilität von PC- Chromopeptidgemischen in Lösung:
 ".": pH=5.2, Stehen im Licht bei RT; "o": pH=5.2, Stehen im Dunkeln bei RT; "Δ": pH=5.2, Stehen im Dunkeln bei +4C; "x": pH=0.5, Stehen im Dunkeln bei RT; "□": pH=9.7, Stehen im Dunkeln bei RT



Zur Umsetzung mit 2- Mercaptoethanol mußte das Peptidgemisch zuerst in ein gepuffertes Medium mit einem pH ≥ 5 überführt werden, da das Thiol im Säuren nur unvollständig oder überhaupt nicht an den Chromophor band.

Das Peptidgemisch wurde in 0.1M Amoniumacetatpuffer (pH=5.1) mit Argon gesättigt (λ_{max} =620, 338, 274nm), und mit 9 Vol. % Mercaptoethanol umgesetzt. Die Abnahme der Extinktion im Langwelligen wurde spektroskopisch verfolgt, nach ca. 15min konnte keine Änderung mehr festgestellt werden. Die gelbe Lösung zeigte ein Maximum bei 405nm mit einer Restabsorption ($\approx 15\%$) bei 620nm (Abb. 42). Unter Argon wurde das Reaktionsgemisch 5min mit Weißlicht bestrahlt. Dabei verschob sich das Maximum der Rubinoidbande geringfügig längerwellig (λ_{max} =408nm) unter gleichzeitigem Rückgang der Extinktion ($\approx 8\%$). Die Absorptionsbande im langwelligen Bereich verlagerte sich kürzerwellig auf 600nm, ihre Intensität ging ebenfalls noch mehr zurück (auf 10%). Durch Ansäuern mit konzentrierter HCl konnte das Nucleophil eliminiert werden, dabei schlug die Farbe nach Blau um (pH=0.9, λ_{max} =620nm).

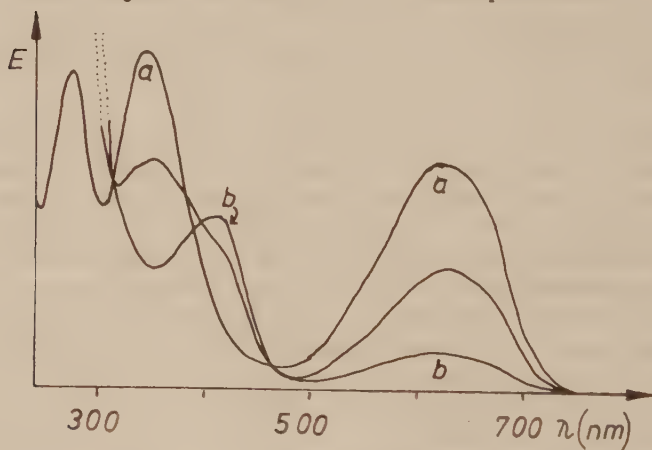
Bestrahlte man das im Rubinoidzustand belichtete Peptidgemisch anschließend als Verdin in saurem Medium mit Weißlicht, verschob sich das Absorptionsmaximum langwellig auf

632nm. Dabei ging gleichzeitig die Extinktion leicht zurück ($\approx 3\%$). Das Endprodukt der Belichtung war identisch zum Ausgangsprodukt der Reaktion.

Das Resultat bewies, daß durch Belichtung des C-10 Additionsproduktes auch bei proteingebundenen Chromophoren eine Z/E- Isomerisierung erreicht werden konnte.

In einem Kontrollversuch wurde das Peptidgemisch unter denselben äußeren Bedingungen, nur ohne Anlagerung des Thiols, 10min mit Weißlicht bestrahlt. Dabei verschoben sich die Maxima von 626 auf 608nm, sowie von 342 auf 330nm. Parallel zum Rückgang der Extinktion der langwelligen und der Soretbande entstand eine Schulter bei $\approx 520\text{nm}$ (Abb. 43). Unter diesen Bedingungen wurden vermutlich Photooxidaionsprodukte (Purpurine) gebildet.

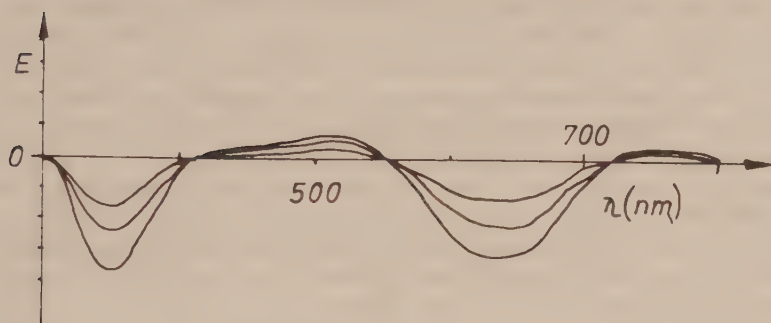
Abb. 42: Absorptionsspektrum eines PC- Chromoptidgemischs in neutralem 0.1M Ammoniumacetatpuffer: a) vor, b) nach Zugabe von 10 Vol. % 2- Mercaptoethanol



Erfolgreich wurde die Methode von FALK (1980) auch schon von THÖMMLER und RÖDIGER (1983) bzw. THÖMMLER (1984) auf Pr-Peptide (aus Hafer) und PC- Peptide (aus Spirulina maxima) angewendet.

Bei den PC- Peptiden lagen die Chromophore nach Abbau mit Pepsin gebunden an Peptidbruchstücke von 5 bis 25 Aminosäuren vor. Sowohl am Peptidgemisch, als auch an den 9 durch isoelektrische Fokussierung getrennten Peptiden, wurde über die Belichtung der Mercaptoethanol- Additionsprodukte ein

Abb. 43: Absorptionsdifferenzspektrum eines PC-Chromopeptidgemischs in neutralem 0.1M Ammoniumacetatpuffer: unbelichtet minus belichtet (10min hv)



Anteil von ca. 20% (Endausbeute) Chromophore mit 4Z,10Z,15E-Konfiguration erhalten (THÜMLER und RÜDIGER, 1983). Eine Separierung von ZZE/ZZZ- Peptiden, ähnlich der Trennung bei Modellchromophoren wie DHOEBV an Kieselgel, erlaubte die spektroskopische Charakterisierung der reinen ZZZ- und ZZE- Isomeren, sowie deren Photoumwandlung unter wechselnden pH-Bedingungen. Das einem Peptid mit ZZE- konfiguriertem Chromophor zugehörige Absorptionsspektrum zeigte bei pH= 1 (Kation) Maxima bei 575 sowie ca. 330nm. Das Spektrum des ZZZ- Chromophors (pH=1, nach 10sec Weißlicht) wies ein Maximum bei 620nm mit einer Schulter um 650nm auf. Die Soretbande blieb in ihrer Lage unverändert. Die Änderung der Intensitäten der Absorptionsbanden verhielt sich analog wie bei der P_{fr}/Pr - Umwandlung.

Wurde Pr proteolytisch abgebaut, so wies das gereinigte, angesäuerte P_{fr} - Chromopeptid Absorptionsmaxima bei 590 und 378nm auf (THÜMLER und RÜDIGER, 1983). Das durch kurze Weißlichtbestrahlung erzeugte Pr - Peptid zeigte ein bathochrom verschobenes Maximum bei 665nm, sowie eine nur geringfügig verlagerte Soretbande bei 372nm. Zugleich wurde die Intensität der kurzwelligen Bande erhöht, die der langwelligen, entsprechend der Konformationsänderung zum helicalen Chromophor, verringert. Diese Photokonversion entspricht einer ZZE/ZZZ- Isomerisierung am 2,3- Dihydrobilatrien- a,b,c Chromophor.

Basierend auf den Daten der E/Z- Isomerisierung bei PC- Peptiden von THÜMLER und RÜDIGER (1983) wurden später auch die absoluten Anteile der ZZZ- und ZZE- Isomeren an integralem PC und seinen Untereinheiten im sauer denaturierten Zustand (8M Harnstoff, pH≈2) bestimmt (siehe B. 2.2.1 und C. 2.2.3).

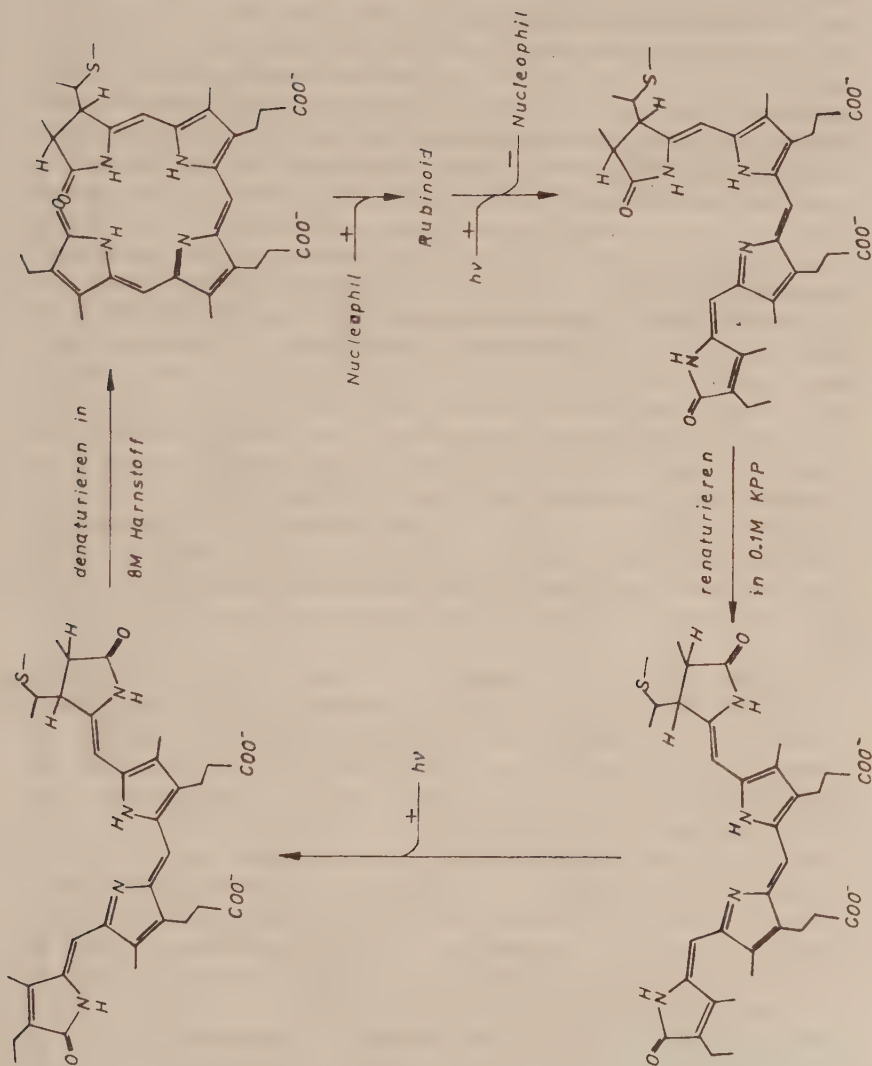
2.2 Konfigurationsisomere bei harnstoff- denaturiertem Phycocyanin sowie seiner α - und β - Untereinheit

PC liegt im nativen Zustand (z.B. in 0.1M Kaliumphosphatpuffer, pH=7) als Trimer vor, wobei die neun mit dem Protein stark wechselwirkenden Chromophore (Schema 8) eine relativ gestreckte Konformation aufweisen. Die Geometrie, bestimmt durch die Proteinumgebung, beträgt anti- Z, syn- Z, anti- Z. (Schema 2) bezogen auf die drei Methinbrücken C-4, C-10 und C-15. Die Position und die Ausrichtung der Chromophore im Protein konnte durch die Röntgenstrukturanalyse an kristallinem PC (Trimere aus Mastigocladus laminosus und Hexamere aus Agmenellum quadruplicatum) von SCHIRMER et al. (1985, 1986) genau festgelegt werden (siehe B. 2.4).

Wird das Protein (reversibel) entfaltet, durch Hitze, Guadiniumchlorid, 8M Harnstoff (KUFER und SCHEER, 1979), oder auch durch Tenside (die Wirkung von Tensiden ist noch nicht voll abgeklärt, siehe B. 2.4.2.4), nimmt der Chromophor eine helikale Konformation (3b), ähnlich der von freien Bilatrienen, ein; die Konfiguration an den drei Methinbrücken beträgt dann all- syn- Z (Schema 8). Im Absorptionsspektrum drückt sich dies aus in einer hypsochromen Verschiebung des langwelligen Absorptionsmaximums von 614 auf 608nm, sowie in einer Verringerung der Intensität dieser Bande auf ca. ein Sechstel (KUFER, 1980). Im vollständig denaturierten Zustand liegt PC monomer und gespalten in seine α - und β - UE vor.

KUFER und SCHEER (1979) haben gezeigt, daß eine reversible Anlagerung von Dithionit an C- 10 sowie eine vollständige Reduktion zum Phycorubin mit Natriumborhydrid nur dann quantitativ verläuft, wenn PC vollständig denaturiert (8M Harnstoff) eingesetzt wird. Im nativen Zustand erforderte eine Reduktion erheblich höhere Konzentrationen an Reduktionsmittel und lief zudem nur unvollständig (zu maximal 40%) ab. Aufgrund dieser Untersuchungen erschien zunächst auch die Addition von Mercaptoethanol nur bei denaturiertem Protein (Schema 8) erfolgversprechend durchführbar zu sein, da der Chromophor in diesem Zustand frei zugänglich vorliegt (vergleichbar zu enzymatisch abgebauten PC).

Schema 8: Konformation und Konfiguration von PC- Isomeren in nativem und denaturiertem Zustand vor und nach Belichtung des Rubinoids



2.2.1 Ermittlung der Reaktionsbedingungen

Die Addition von Mercaptoethanol an mit 8M Harnstoff denaturiertem Phycocyanin wurde in gepuffertem Medium (0.1M Kaliumphosphat) bei neutralen pH- Werten durchgeführt. Bei niedrigerem pH (< 6.0) erfolgte, wie bei Peptiden, keine oder nur unvollständige Anlagerung des Nucleophils.

Das gereinigte und lyophilisierte PC wurde dazu in wenig Harnstoffpuffer gelöst und im grünen Sicherheitslicht unter Einleiten von Ar (oder N_2) zur Verhinderung unerwünschter Nebenprodukte mit Mercaptoethanol umgesetzt. Dabei wurde das Reagenz im Überschuß zugegeben (Tabelle 12), um Reaktionszeit und Verweildauer des Thiols in der PC- Lösung möglichst kurz zu halten. Bei längeren Einwirkungszeiten sank erfahrungsgemäß die Ausbeute des durch Ansäuern wiedergewonnenen Verdins deutlich. Durch die große Menge Reduktionsmittel erfolgte ein sofortiger Farbumschlag von blau (612/354nm) nach gelb (414nm). Eine bevorzugte Anlagerung bei niedrigen Temperaturen, vergleichbar den freien Biliatrienen (FALK et al., 1980), wurde dabei nicht beobachtet, die Reaktion deshalb bei Raumtemperatur ausgeführt (Abb. 44). Ausschlaggebend für eine vollständige Reaktion der Phycocyanobilinchromophore zum Rubinoid war nicht allein das Molverhältnis Thiol/Chromophor, sondern sein Volumenanteil an der Gesamtlösung. Bei Zugabe von 3.2 Vol. % erfolgte Addition nur zu 83% (Rückgang der langwelligen Absorption), am Besten erwies sich ein Anteil von 15-20 Vol. % Mercaptoethanol in der Probe.

Je vollständiger die Anlagerung, um so höher war im Endeffekt auch die Ausbeute an ZZE- Isomeren. Sie fand jedoch insgesamt bei niedrigeren Mercaptoethanolmengen als bei PC-Peptiden statt (Restabsorption, siehe B. 2.1), die dazu einen Volumenanteil von 40% Thiol in der Probe erforderten (THÖMLER und RÜDIGER, 1983).

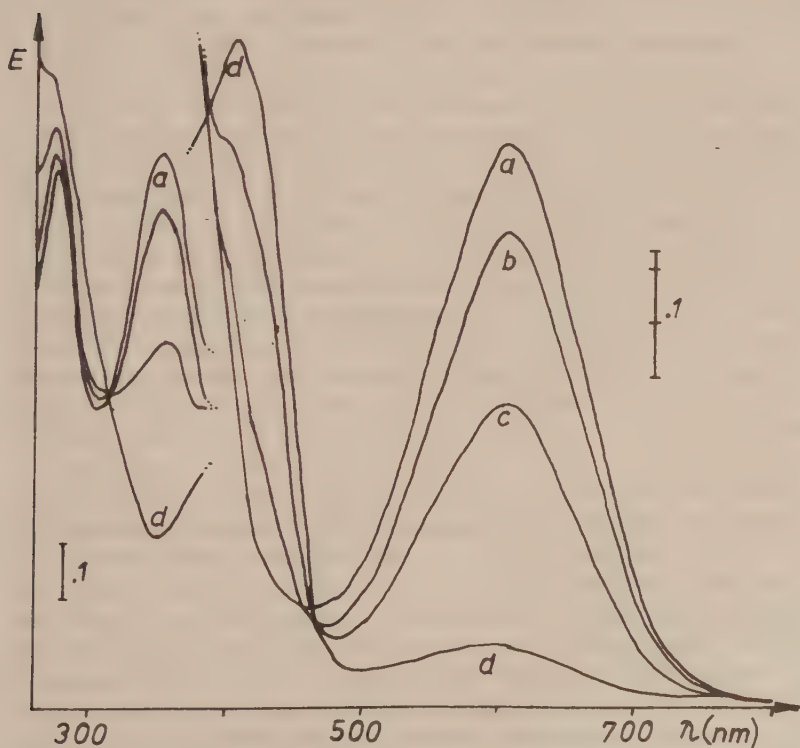
Nach Belichtung mit Weißlicht und Eliminierung des Thiols durch Absenken des pH- Wertes auf ≈ 2.0 , mußte das Reduktionsmittel (wie bei freien Chromophoren) sofort aus der Probe entfernt werden. Dies geschah durch Säulenchromatographie an einem sphärischen Polyacrylamid- Gel. Die Ausbeute an gereinigtem Isomerengemisch (ZZE/ ZZZ, Schema 8) betrug im Optimalfall 75 bis 80% des ursprünglich eingesetzten PC's. Das Phycocyanin lag danach in sauer denaturierter Form vor.

Die Photoaktivität der Mischung wurde getestet durch Aufnahme eines Differenzspektrums der unbelichteten (partiell iso-

merisierten) minus der sättigend belichteten (alle Chromophore ZZZ- konfiguriert) Probe. Der ermittelte Differenzbetrag (Minimum/Maximum) wurde prozentual in Bezug gesetzt zur Gesamttextinktion der belichteten Probe (ZZE- Ausbeute: $\Delta E/E$, Tabelle 12). Durch Multiplikation mit dem Korrekturfaktor 0.86, ermittelt aus der E/Z- Isomerisation bei Peptiden (siehe B. 2.1 und C. 2.2.3) konnte der absolute Anteil (in Prozent) an ZZE- Isomeren in der Mischung berechnet werden (nur in den Tabellen angeführt).

[Die quantitative Bestimmung der ZZE- Isomerenausbeute wurde durchgehend (in allen folgenden Experimenten mit Konfigurationsisomeren des Phycocyanins) in sauer denaturiertem (8M Harnstoff/HCl) oder nativem (0.1M KPP) Zustand durchgeführt].

Abb. 44: Titration von PC in 2ml 0.1M KPP, pH=7.1 mit 2- Mercaptoethanol: a) PC nativ, sowie nach b) 5 μ l, c) 20 μ l, d) 200 μ l Thiol



Verblieb Mercaptoethanol im Isomerengemisch, so änderte sich das E/Z- Verhältnis, vergleichbar zu den freien Tetrapyrrolochomophoren, drastisch (siehe B. 1.1.2.2). Eine Probe des in sauer denaturiertem Zustand mit Thiol aufbewahrten PC's zeigte nach 12 Stunden (6C, dunkel) nur noch 62% der gleich nach der Isomerisierung festgestellten Aktivität. Die Stabilität der Photoisomeren in saurem Harnstoffpuffer ohne Reduktionsmittel war dagegen deutlich erhöht (siehe B.2.2.2.2)

Neben der Darstellung von denaturiertem PC mit ZZE- konfigurierten Chromophoren sollte auch versucht werden, natives PC mit entsprechend modifizierten Chromophoren zu erhalten. Es erwies sich als notwendig, die (primäre) Entfernung des Thiols, sowie die Renaturierung des Proteins in zwei Schritten durchzuführen. Die Eliminierung des Nucleophils durch Säure erforderte auch seine Entfernung aus der Reaktionsmischung im Säuren. Stieg der pH- Wert an, führte dies zu einer erneuten Anlagerung an C-10. Damit wurde auch das durch Belichtung neu eingestellte Gleichgewicht von Z,-,Z und Z,-,E- Isomeren gestört und die Ausbeute an ZZE- (bestimmt nach Eliminierung) reduziert.

Die nachfolgende Renaturierung erfolgte über dasselbe Gelmaterial wie die Abtrennung des Thiols. Um den pH- Wert während der Entfernung von Harnstoff auf einen neutralen Bereich (≈ 7) anzuheben, wurde in neutralem, höher molarem, Phosphatpuffer (0.1M) gearbeitet. Niedrigere Phosphatkonzentrationen bzw. Equilibrieren der Säule mit bidestilliertem Wasser bewirkten eine starke Verdünnung sowie einen niedrigen pH- Wert des Eluats. Die Renaturierung dauerte länger, PC "schmierte" über die ganze Säule, die Ausbeute an harnstofffreiem PC blieb gering und es lag nach wie vor als Kation vor. Für IR- Messungen wurde das Isomerengemisch gegen 5mM KPP dialysiert.

Die Ausbeute an ZZE- Isomeren (wird in der Folge immer mit $\Delta E/E$ in % angegeben, im Gegensatz zum absoluten ZZE- Anteil in saurem 8M Harnstoffpuffer, der durch Multiplikation mit dem Korrekturfaktor erhalten wird, siehe C. 2.2.3) wurde im sauer denaturierenden Medium bei einem pH von ≈ 2.7 als Richtwert für die Photoumwandlung herangezogen. Dies diente als Standart für die Photoaktivität der Reaktionsmischung. Basierend auf dieser Information, wurde im neutralen Milieu bei ≈ 7 die Amplitude $\Delta E/E$ (in %) des Differenzsignals ΔE bei Belichtung zur Absorption E (der belichteten Probe) als Aussage über die Photoaktivität im nativen PC herangezogen.

Da die Gesamtausbeute, wie in Tabelle 12 gezeigt, in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen Schwankungen unterworfen war, wird bei allen folgenden Untersuchungen der Ansatz mit aufgeführt, um einen Vergleich aller Reaktionen (auch aus verschiedenen Präparationsansätzen) untereinander zu ermöglichen.

Tabelle 12: Ermittlung des Anteils an ZZE- Chromophoren in Abhängigkeit von der angewendeten Präparationsmethode

Ansatz (Nr.)	1	2	3	4
c (PC) ¹ (mg/ml)	0.8	1.62	3.19	2.46
Thiol (Vol. %) ²	21.0	13.8	12.5	16.6
Belichtungs- dauer (min) ³	10	10	15	15
Säure (Vol. %) ⁴	1.3	5.7	7.0	6.3
ZZE- Ausbeute: ($\Delta E/E$ in %) ⁵				
denatur. (pH) ⁶	17.7 (3.0)	13.3 (2.9)	9.1 ⁷ (2.7)	13.0 (2.7)
nativ (pH) ⁸	3.9 (3.7)	4.4 (7.8)	2.0 (7.5)	3.6 (6.8)

- 1) Konzentration des eingesetzten, lyophilisierten PC's
- 2) Volumenanteil Mercaptoethanol
- 3) Belichtungseinrichtung siehe C. 1.5
- 4) Volumenanteil an konzentrierter Salzsäure zur Eliminierung des Thiols
- 5) Prozentsatz berechnet aus der Extinktionsdifferenz Minimum/Maximum (ΔE) des Differenzspektrums zur Absorption (E) der belichteten Probe (ohne Korrektur!)
- 6) Isomerengemisch nach Aufreinigung in 8M Harnstoff (enthält 0.1M KPP, sauer)
- 7) mit Mercaptoethanol in der Meßlösung
- 8) Isomerengemisch nach Renaturierung in 0.1M KPP (neutral)

Die Ausbeute ($\Delta E/E$) an ZZE- isomerisierten Chromophoren, bestimmt in sauer denaturiertem Zustand, war am größten (17.7%) bei einem Anteil von 21 Vol. % Mercaptoethanol, das entsprach einem Überschuß von $171.1 \cdot 10^3$ Mol Nucleophil pro Mol Chromophore. Bei geringeren Mercaptoethanolmengen lag

sie bei 13% (16.6 Vol. %, bzw. $39.4 \cdot 10^3$ Mol/Mol PC- Chromophor) sowie nahezu identisch bei 13.3% (13.8 Vol. %, bzw. $50.5 \cdot 10^3$ Mol/Mol Chromophor). Die im ersten Ansatz, verglichen zu den anderen, geringe Menge Salzsäure, die zur Eliminierung des Thiols eingesetzt wurde, sollte keinen Einfluß auf den Isomerisationsgrad haben, da alle Proben nach dem Ansäuern unverzüglich auf die sauer equilibrierte Säule aufgetragen wurden. Eine Verlängerung der Belichtungszeiten brachte keine sichtbaren Ausbeuteverbesserungen. Aus anderen Untersuchungen mit den Modellpigmenten ging hervor, daß längere Belichtung zu einem irreversiblen Ausbleichen der Lösung durch den Abbau der Chromophore führen kann (siehe B. 1.1.2.1).

2.2.2 Bestimmung des ZZE- Isomerenanteils in denaturiertem Phycocyanin nach Abtrennung von Mercaptoethanol

2.2.2.1 Abhängigkeit vom pH- Wert

Die schon bei leichten pH- Unterschieden auftretenden Differenzen in der bestimmbaren ZZE- Gesamtausbeute führten zu einer genauen Untersuchung der pH- Abhängigkeit der mittels Absorptionsdifferenzmessungen erhaltenen Werte (Tabelle 13).

Das Isomerengemisch aus ZZZ- und ZZE- konfigurierten Chromophoren zeigte nach Abtrennung des Mercaptoethanols in saurem Harnstoffpuffer (pH=2.9) ein Absorptionsspektrum (Abb. 43), welches sich vom reinen ZZZ- Isomeren nur durch eine ausgeprägtere kurzwellige Flanke im langwelligen Absorptionsmaximum unterschied. Durch Weißlichtbestrahlung wurde diese Flanke reduziert, parallel dazu stieg die Extinktion im Maximum bei 660nm an. Eine Verschiebung des Maximums war dabei nicht feststellbar.

Da das ZZE- Isomere von PC- Peptiden bei pH=1.0 (Kation) deutlich kürzerwelliger absorbierte ($\lambda_{max} = 575\text{nm}$) als das ZZZ- Isomer ($\lambda_{max} = 620\text{nm}$), konnte man für reine ZZE- Isomere im integralen, sauer denaturierten Phycocyanin von ähnlichen Absorptionsunterschieden ausgehen. Weil der Extinktionskoeffizient für das ZZE- Chromopeptid größer ist (THÖMMLER und RÜDIGER, 1983) als der für das ZZZ-, wurde bei der Rückisomerisierung der Peptide eine niedrigere Extinktion des langwelligen Hauptmaximums für das stabile ZZZ- Isomer erhalten und analoges auch für denaturiertes PC erwartet.

Die leichte Zunahme im Maximum des ZZE- PC- Absorptionsspektrums wäre unter der Annahme, daß das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten ($ZZE > ZZZ$) auch für die Chromophore in kationischer Form bei denaturierten Proteinen Gültigkeit hat, durch den geringen ZZE- Anteil zu erklären, der nur eine leichte Schulter im ZZE- Gesamtspektrum erzeugte. Entsprechend der Roten, zeigte sich auch für die Soretbande bei Belichtung eine geringe Zunahme in der Extinktion, ohne daß sich das Maximum bei 354nm verschob.

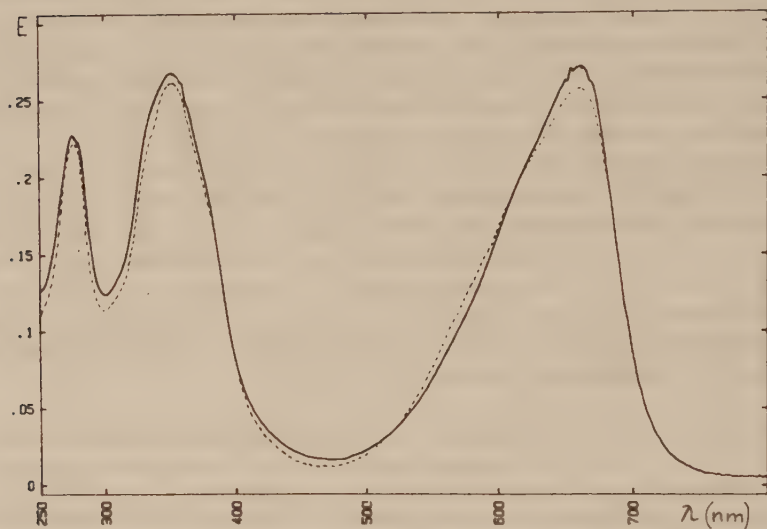
Möglicherweise hat die Konfigurationsänderung des Chromophors größere Auswirkungen auf das umgebende Protein (verminderte Wasserstoffbrückenbildung, etc.). Dadurch würde auch in sauer denaturiertem Zustand eine exakte Einpassung des Moleküls in das Proteingerüst verhindert und somit eine niedrigere Extinktion der ZZE- Isomere (im Gegensatz zu den Chromophoren an kurzen Peptidbruchstücken, oder auch freien Dihydrobilatrienen) erklärt.

Tabelle 13: pH- Abhängigkeit des spektroskopisch nachweisbaren ZZE- Isomerengehaltes in 8M Harnstoffpuffer

pH - Wert	Belichtgs.-zeit (sec) ¹	Differenz		Absorption	ZZE- Gehalt (%)	
		Extrema (nm)	ΔE^2		gem. ⁴	korrr. ⁵
1.5 ⁷	20	577/671	0.01	0.088	11.4	9.8
2.7 ⁷	40	572/665 ⁶	0.014	0.12	11.7	10.1
2.9 ⁷	30	575/670	0.035	0.265	13.3	11.4
3.6 ⁷	70	575/671	0.027	0.22	12.2	10.5
5.7 ⁷	30	572/669	0.03	0.253	11.7	10.1
6.9 ⁷	75	566/671	0.013	0.126	10.2	8.8
8.6 ⁷	10	516/630	0.0014	0.963	1.4	1.2
2.7 ⁸	30	575/667 ⁶	0.014	0.152	9.1	7.8
8.0 ⁸	90	-	0.0	0.144	0.0	-
12.2 ⁸	120	-	0.0		0.0	-

- 1) Sättigende Belichtungszeit, Belichtungsstufe I, Weißlicht (siehe C. 1.5)
- 2) Gesamtsignalhöhe Minimum/Maximum
- 3) Absorption der langwelligen Bande bei 660nm nach sättigender Belichtung
- 4) ZZE- Ausbeute: ΔE in Prozent der Extinktion des langwelligen Absorptionsmaximums -
- 5) absoluter ZZE- Anteil (nach Korrektur, siehe C. 2.2.3)
- 6) mit Mercaptoethanol in der gemessenen Probe
- 7) Proben aus Ansatz 2 (siehe Tabelle 12)
- 8) Proben aus Ansatz 3 (siehe Tabelle 12)

Abb. 43: ZZE/ZZZ- Isomerengemisch von PC nach Präparation in 8M Harnstoffpuffer (0.1M KPP, pH=2.9): (....) vor, (—) nach 30sec Weißlicht (Belichtungsstufe I, siehe C. 1.5)



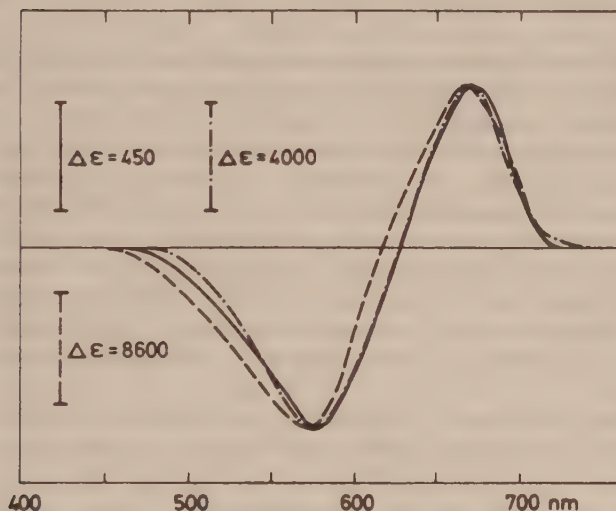
Das Absorptionsdifferenzspektrum bei Peptiden von unbelichteter (ZZE) minus belichteter Probe (ZZZ), zeigte bei pH=1 eine Abnahme bei 568nm sowie eine Zunahme bei 662nm; das Spektrum war nahezu symmetrisch (Abb. 44). Das Differenzspektrum des sauer denaturierten Isomerengemisches von PC (ZZZ/ZZE minus ZZZ) erwies sich als qualitativ nahezu identisch zu den Differenzspektren der Peptide; es hatte ein Minimum bei 575nm sowie ein Maximum bei 670nm (Abb. 44).

Wurde der pH- Wert des Isomerengemisches von pH=2.9 (ZZE-Ausbeute 13.3%) weiter abgesenkt, reduzierte sich auch geringfügig die durch Belichtung mit Weißlicht feststellbare Rückisomerisationsrate (Tabelle 13). Bei freien Gallenfarbstoffen wurde der instabile ZZE- Chromophor in einer Dunkelreaktion protonenkatalysiert zum energetisch begünstigten ZZZ konvertiert (siehe B. 1.1.3.3). Ein ähnliches Verhalten für den helikalen, protonierten ZZE- Phycocyaninchromophor würde diese Meßwerte erklären. Je niedriger der pH, um so kürzer wurden auch die zur Absättigung der Rückreaktion benötigten Belichtungszeiten. Auch bei OEBV/DHOEBV revertierten die ZZE- Isomere als Kationen mit erheblich niedrigeren Belichtungszeiten zu ZZZ (siehe B. 1.1.3.3).

Fortdauernde Einstrahlung resultierte in einem Ausbleichen

der Absorption (entspricht wahrscheinlich den (Photo-) Oxidationen bei freien Chromophoren, siehe B. 1.1.3.5).

Abb. 44: Absorptionsdifferenzspektren ZZE minus ZZZ bei:
(- - -) Peptiden (pH=1), (- - -) über das Rubinoid präparierten PC- Isomeren und (—) lyophilisiertem PC (8M Harnstoffpuffer, pH=1.9)



Bei Erhöhung des pH- Wertes (2N NaOH/KOH) wurde ebenfalls eine Abnahme des gemessenen Effektes erkennbar (Tabelle 13). Prinzipiell änderte sich das Absorptionsspektrum von denaturiertem PC bei Neutralisation drastisch. Das langwellige Absorptionsmaximum erfuhr einen hypsochromen Shift von 660 auf ca. 610nm, gleichzeitig ging die Extinktion um Faktor zwei zurück (Extinktionskoeffizienten: 30300 bzw. 15400 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pro Chromophor: KUFER, 1980). Dabei wurde die im Kation scharfe Bande verbreitert und unstrukturiert. Die Soretbande veränderte sich nur unwesentlich ($\epsilon = 37000$ bzw. $34900 \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pro Chromophor: KUFER, 1980; keine Verschiebung des Maximums).

In neutralem harnstoffdenaturiertem Milieu (pH=6.9) unterschieden sich die Absorptionsspektren des ZZZ/ZZE- Gemisches und der reinen ZZZ- Isomere kaum. Das Differenzspektrum zeigte ein etwas ins Kürzerwellige verschobenes Minimum (566nm) als im Sauren (575nm), das Maximum blieb unverändert. Die feststellbare ZZE- Ausbeute ($\Delta E/E$) betrug nur noch

drei Viertel des bei $\text{pH}=2.9$ gemessenen Effektes. Weiterer pH -Anstieg auf 8.5 verschob die Absorption von belichteter und unbelichteter Probe noch kürzerwelliger: $\text{ZZE}/\lambda_{\text{max}}=592\text{nm}$, $\text{ZZZ}/\lambda_{\text{max}}=594\text{nm}$. Das erhaltene Differenzspektrum hatte nun ein Minimum bei 516nm und ein Maximum bei 630nm ; die Rückisomerisation fand nur noch zu einem sehr geringen Teil statt (Tabelle 13). Die Photoumwandlung war bereits nach 10sec abgesättigt.

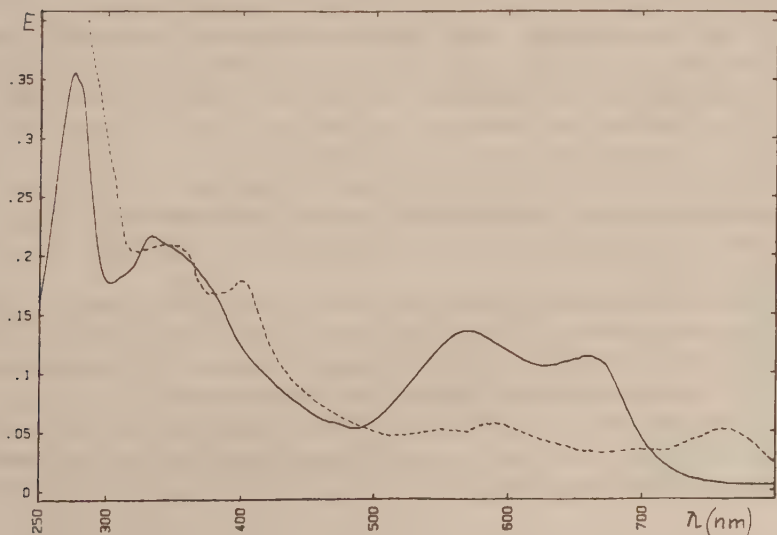
Eine Erklärung dafür könnte wachsende Instabilität des ZZE-Chromophors analog dem stark sauren Zustand sein, der eine im Meßintervall nicht mehr quantitativ erfassbare Photoumwandlung hervorruft. Die zweite Möglichkeit wäre die Stabilisierung des ZZE-Isomers in neutraler bzw. leicht alkalischer Umgebung gegenüber Belichtung durch eine Verschiebung des Gleichgewichtszustandes auf die Seite des ZZE-PC's. Das Differenzsignal kann jedoch auch aufgrund der Angleichung der Spektren von ZZZ und ZZE bei diesem pH -Wert kleiner geworden sein und sich deshalb quantitativ nicht unmittelbar mit dem $\Delta E/E$ -Wert in saurer Umgebung vergleichen lassen.

Um diesen Sachverhalt abzuklären, wurde die bei $\text{pH}=8.6$ mit Weißlicht belichtete Probe, bei der nur eine ZZE-Ausbeute ($\Delta E/E$) von 1.4% festgestellt wurde (Tabelle 13), im Dunklen mit HCl auf einen pH von 2.2 eingestellt. Nach einer erneuten Weißlicht-Bestrahlung von 30sec wurde ein Differenzspektrum gemessen, dessen Extrema denen der unmittelbar im Sauren belichteten Proben glichen. Der gemessene Photoeffekt lag bei 5.2% . Analoge Versuche an Proben aus unterschiedlichen Präparationsansätzen erbrachten vergleichbare Resultate.

Diese Messungen zeigten deutlich, daß neutrale Umgebung ZZE-Chromophore stabilisiert. Es beweist aber auch, daß sie gegen Belichtung nicht völlig inert sind; dies wurde von THÜMLER und RÖDIGER (1983) für ihre präparierten ZZE-Chromophore bei PC-Peptiden im Neutralen angencmmen. Der Unterschied zwischen einem peptisch abgebauten oder einem durch Harnstoff entfalteten Protein sollten jedoch nicht derart gravierende Unterschiede auf die Eigenschaften der Chromophore haben (Einfluß des Proteins nahezu ausgeschaltet; das Absorptionsspektrum eines sauren, mit Pepsin abgebauten PC's unterschied sich nicht von intaktem, aber in saurem, 8M Harnstoff denaturiertem, Biliprotein).

Wurde die Phycocyaninlösung mit Lauge auf einen pH von 12.2 eingestellt, erhielt man das Absorptionsspektrum eines partiell deprotonierten Pigments (Abb. 45). Es zeigten sich Banden bei 762nm (Anion) und 583nm mit zwei Schultern bei 626 und 535nm, im Kurzwelligen bei 402nm (Pyrromethanonbande?) sowie der Soretbande bei 348nm. Beim Belichten der Lösung wies das Differenzspektrum auf unterschiedlich starkes Ausbleichen bei 591, 525, 515 und 409nm hin. Im Gegensatz zum leicht Alkalischen, wurde in diesem Fall auch nach Ansäuern auf pH=1.6 und Belichtung mit Weißlicht kein für eine ZZE/ZZZ- Isomerisierung typisches Differenzspektrum mehr erhalten: reines Ausbleichen war zu beobachten. Auch das Absorptionsspektrum der belichteten Probe war deutlich unterschiedlich zu anderen sauren Proben. Es wies ein Doppelmaximum bei 581 und 656nm auf, die Soretbande absorbierte bei 331nm. Mit Sicherheit wurde das Protein in denaturiertem Zustand durch Deprotonierung irreversibel geschädigt (KRAUSS, 1980). Dies führte auch bei PC vermutlich zu einer sehr raschen Umwandlung der Photoisomeren, wie für freie Gallenfarbstoffchromophore beschrieben (siehe B. 1.1.3.3). Unterstützt wurde dies auch durch die Beobachtung, daß auch in der zunächst im Alkalischen unbelichtet gebliebenen Referenz nach anschließendem Ansäuern keine E/Z- Photoreaktion festgestellt werden konnte.

Abb. 45: Absorption von ZZZ- PC in 8M Harnstoffpuffer (0.1M KPP, KOH, pH=12.2): (---) und nach Ansäuern mit HCl (pH=1.5): (—)



Die im sauer denaturierenden Medium gemessenen Differenzspektren des modifizierten Phycocyanins legten, im Vergleich mit der ZZE - ZZZ Umwandlung an den freien Modellbilinen DHOEBV und OEBV sowie PC- Peptiden nahe, daß bei Belichtung des Rubinoids eine Isomerisierung an der C-15 Doppelbindung eintrat.

Bei denaturiertem Phycocyanin ging man bisher davon aus, daß sämtliche Chromophore, durch das entfaltete Protein nicht mehr beeinflußt, gleichermaßen durch das Nucleophil angreifbar werden. Man sollte dann auch annehmen, daß nach vollständiger Überführung in den rubinoiden Zustand alle in der Lösung befindlichen, proteingebundenen Chromophore gleichberechtigt gegenüber der ZZZ/ZZE- Isomerisierung reagieren. Bei 2,3- Dihydrobilatrienen (z.B. DHOEBV) mit, vergleichbar dem PC, hydrierten Ring A, konnte bisher nur das 4Z.10Z.15E- Isomere isoliert werden. Eine Konversion an C- 4 kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Wie bei freien Modellbilinen gezeigt (siehe B. 1.1.2), können diese nur unter bestimmten Voraussetzungen stabilisiert werden. Im Normalfall entziehen sich durch ihre schnelle Reversion in den stabilen ZZZ- Zustand (siehe Schema 3) einem (absorptionsspektroskopischen) Nachweis.

Auch bei PC wird deshalb bei dem festgestellten Photoprodukt aus der Belichtung des Rubinoids von einem zwischen Ring C und D an C- 15 isomerisierten Chromophor ausgegangen.

2.2.2.2 Stabilität der Isomere

Auf die Instabilität der Stereoisomeren in Gegenwart von Mercaptoethanol wurde schon verwiesen (siehe B. 2.2.1).

In tiefgefrorenem Zustand konnten Isomerengemische ohne Thiole, jedoch bei niedrigen pH- Werten (2-3), kürzere Zeiten (1-2 Wochen) problemlos aufbewahrt werden (dunkel). Nach dem Wiederauftauen zeigte sich kein nennenswerte Aktivitätsverlust gegenüber einer frisch präparierten Probe. Längere Lagerzeiten resultierten in einem Rückgang des ZZE- Isomerenanteils.

Bei dieser Meßreihe (Tabelle 14) lag die größte Stabilität bei pH- Werten von ≈ 3 . Leicht saure bzw. neutrale Gemische zeigten nach langer Aufbewahrungszeit keinerlei Restaktivität. Eine bisweilen starke Trübung der "neutralen" denaturierten PC- Lösungen ließ auf einen möglichen Proteinabbau schließen, der auch auf die Chromophorstruktur Einfluß haben könnte (siehe B. 2.2.3.2).

Tabelle 14: Stabilität des ZZE/ZZZ- Isomerengemisches in 8M Harnstoffpuffer bei Lagerung

pH- Wert	Restaktivität ¹ (%)	Lagerzeit ² (Wochen)
1.5	57	8
2.9	65	12
3.6	63	8
5.7	0	12
6.9	0	8

- 1) Photoisomerisationsrate sofort nach-Auftauen bei Raumtemperatur gemessen, in % der Aktivität ($\Delta E/E$) der frisch präparierten Probe
- 2) dunkel bei minus 18°C

Die Belichtung des ZZE/ZZZ- Gemisches hatte gezeigt, daß die Konfigurationsisomere in sauer denaturiertem Zustand sehr empfindlich auf Licht reagieren. Gleichzeitig beeinflusste jedoch auch eine protonenkatalysierte Dunkelreaktion (siehe B. 1.1.3.3) das Verhältnis von ZZE zu ZZZ.

Im neutralen Milieu trat die bei Belichtung zur E/Z- Isomerisierung konkurrierende Ausbleichreaktion deutlicher hervor. Die Stabilität des ZZE- Isomers schien erhöht, eine vollständige Photoumwandlung zu ZZZ ohne gleichzeitigen Abbau eines Teils der Chromophore war unter den gewählten Bedingungen nicht möglich.

Sowohl bei niedrigen, als auch bei neutralen pH- Werten trat aber mit Belichtung (über das sättigende Maß hinaus) ein immer stärker werdender Ausbleicheffekt (Abnahme der Chromophorabsorption) auf.

Alkalische Umgebung hatte eine sofortige Rückwandlung der ZZE- Isomere zur Folge.

2.2.3 Bestimmung des ZZE- Isomerenanteils in nativem Phycocyanin nach Renaturierung

Die für die Phytochromumwandlung postulierte Isomerisierung im nativen Biliprotein läßt sich an freien Modellchromophoren und auch an Peptiden (Phytochrom und Phycocyanin) nur für die E/Z- Rückreaktion (P_{fr} zu P_r) nachvollziehen, da die unmittelbare Z/E- Isomerisierung an Verdinen dieses Typs unmöglich ist (FALK et al., 1980).

Im Verlauf der bisherigen Untersuchungen an proteingebunde-

nen 2,3- Dihydro- Chromophoren wurde nur die Photoumwandlung (E/Z- Isomerisierung) im denaturierten Zustand (d.h. entfaltet mit 8M Harnstoff oder nach enzymatischem Proteinabbau) untersucht. Die Ähnlichkeit der spektroskopischen Daten zu Phytochrom- Peptiden ließ auf vergleichbare Reaktionen der sehr ähnlichen Chromophore (3a, b) schließen (siehe B. 2.1, THÜMLER und RÖDIGER, 1983).

Die folgenden Untersuchungen sollten zeigen, ob ZZE- Isomere, die im denaturierten Zustand nachweisbar waren, auch in natives (d.h. renaturiertes) Phycocyanin eingebaut werden können, und ob die eventuelle E/Z- Photochemie, vergleichbar zur P_r/P_r - Reversion, abläuft.

Wurde das ZZE/ZZZ- Isomerengemisch renaturiert (siehe B. 2.2.1) und anschließend in neutralem Kaliumphosphatpuffer mit Weißlicht bestrahlt, ließen die Absorptionsdifferenzspektren eine deutliche Photoreaktion erkennen, die auf eine Beständigkeit der ZZE- Isomere auch nach Renaturierung des Proteins hindeuteten.

Bei der Bestimmung des ZZE- "Anteils" in den renaturierten Isomerengemischen fiel als erstes die niedrigeren "Ausbeuten", gestützt auf die bei Belichtung gemessenen Differenzspektren, auf. Bei neutralem pH betrug $\Delta E/E$ (in %) im Durchschnitt ein Viertel des Wertes in sauer denaturiertem Zustand (Tabelle 15). Dieses Verhältnis kann auf eine erhöhte Stabilität des E- Isomers durch die native Proteinumgebung, oder aber auch nur auf die Ähnlichkeit der Absorptionsspektren von PC mit ZZZ- oder ZZE- konfigurieren Chromophoren, und damit auf niedrigere Amplituden der Differenzspektren bei der Photoumwandlung hindeuten (siehe B. 2.2.2.1 und B. 2.2.3.1).

Eine Trennung von renaturierten ZZE/ZZZ- Isomeren wurde bisher noch nicht durchgeführt, deshalb konnte der absolute (quantitative) ZZE- Anteil (wie im sauer denaturierten Protein) nicht ermittelt werden. Die ZZE- "Ausbeute" (die in diesem Fall keine Aussage über die Stöchiometrie gibt, s.o.), wurde auch im Folgenden immer als $\Delta E/E$ (in %), berechnet aus den spektroskopischen Daten (siehe C. 2.2.3), angegeben.

Da sich die Absorptionsmaxima von ZZZ- und ZZE- Isomeren schon im Denaturierten bei neutralen pH- Werten fast nicht unterschieden, die denaturierten ZZE- Isomere sich außerdem bei Belichtung gegenüber dem kationischen Zustand stabilisiert zeigten (siehe B. 2.2.2.1), war ein ähnliches Verhal-

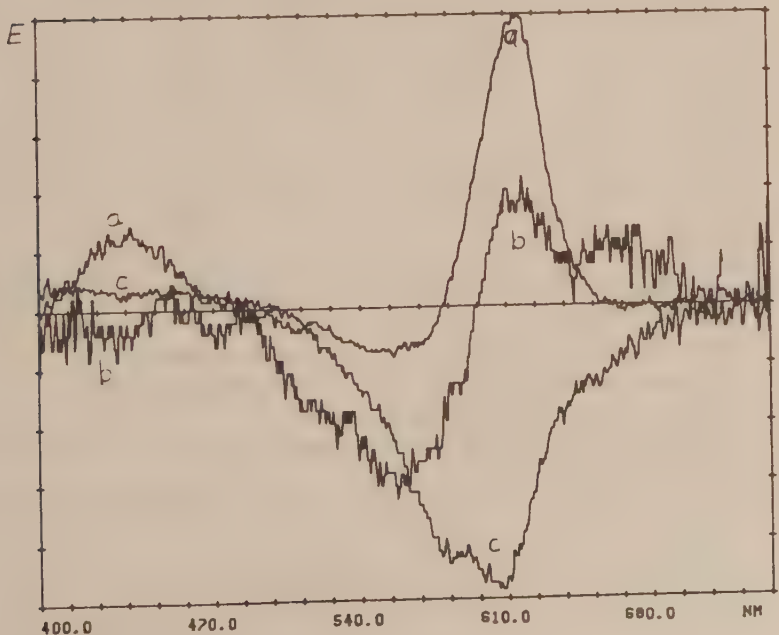
ten auch im nativen Protein erwartet worden.

Ähnlich wie bei denaturierten Stereoisomeren wurde auch im Nativen eine pH-Abhängigkeit bei der Photoumwandlung festgestellt.

2.2.3.1 Abhängigkeit vom pH- Wert

Das charakteristische Absorptionsdifferenzspektrum von ZZE-minus ZZZ- Chromophor in neutralem 0.1M KPP wies eine geringe Abnahme der Absorption bei 575nm sowie eine hohe Zunahme bei $\approx 630\text{nm}$ (Abb. 46a) auf. Damit lag das Minimum bei der gleichen Wellenlänge wie das Minimum in sauer denaturiertem PC (Abb. 44). Im Absorptionsspektrum drückte sich die Differenz in einem minimalen bathochromen Shift von 610 nach 612nm aus. Die Intensität der Bande änderte sich scheinbar nicht.

Abb. 46: Absorptionsdifferenzspektren von ZZE/ZZZ- PC minus ZZZ- PC, belichtet mit Weißlicht (Belichtungsstufe I, siehe C. 1.5) in 0.1M KPP: a) neutral (pH=7.5, 30sec hv), b) sauer (pH=2.8, 30sec hv), c) basisch (pH=10.5, 220sec hv)



Das Verhältnis der Abnahme zur Zunahme (negative bzw. positive Bande) im Differenzspektrum war deutlich anders als bei den mit Harnstoff denaturierten Proben (Abb. 47). Die Differenzsignale der denaturierten Proben erschienen im pH- Bereich 1 - 9 symmetrisch, bei den nativen Proben stand einer kleinen negativen Bande eine große Zunahme entgegen. Die Form des Differenzspektrums änderte sich erst beim Absenken des pH- Wertes. Unterhalb des pKa- Wertes von 5.5 (für nicht modifiziertes PC) ähnelten die Signalverhältnisse denen des denaturierten Proteins.

Tabelle 15: pH- Abhängigkeit der spektroskopisch nachweisbaren ZZE- "Isomerenausbeute"

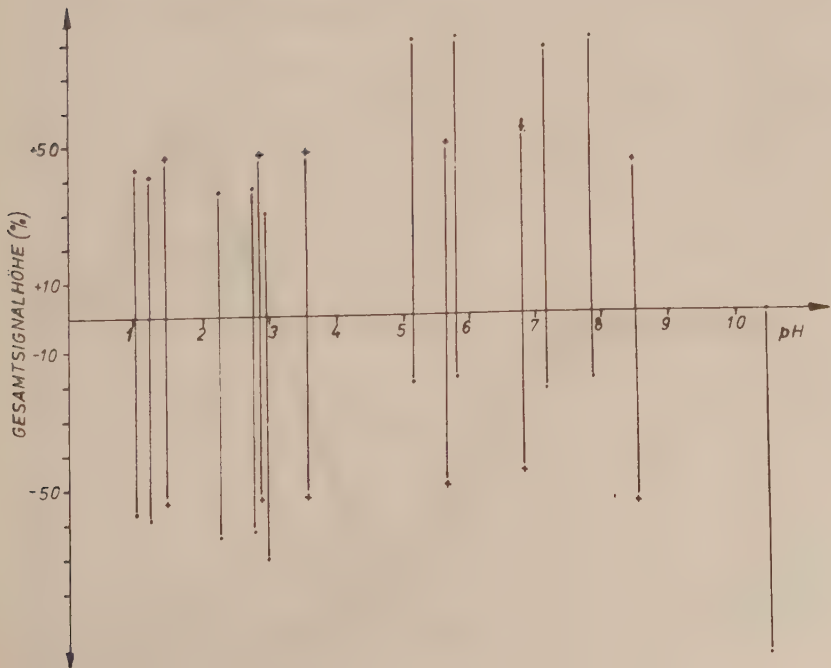
pH - Wert	Belichtgs.-zeit (sec) ¹	Differenz		Absorption	ZZE- Ausbeute ⁶
		Extrema (nm)	ΔE^4	$E \lambda_{max}^5$	gem. ⁶ (%)
1.0 ⁷	180	577/677	0.013	0.135	9.9
1.3 ⁷	150	580/682	0.032	0.325	9.6
2.3 ⁷	310	577/682	0.017	0.335	5.0
2.8 ⁷	30	575/676/630	0.003	0.155	1.9
3.0 ⁷	180	580/674/Sh	0.005	0.124	3.7
5.2 ⁷	20	568/629	0.008	0.232	3.3
5.9 ⁷	20	573/629	0.011	0.267	4.0
7.2 ⁷	10	566/629	0.015	0.35	4.3
7.2 ⁷	80 ²	572/629	0.014	0.349	4.1
7.2 ⁷	360 ³	573/631	0.01	0.246	4.0
7.8 ⁷	30	575/631	0.014	0.31	4.42
10.5 ⁷	20	-	-	0.03	-
2.2 ⁸	120	576/683	0.006	0.246	2.8
7.5 ⁸	60	578/629	0.005	0.313	1.5
10.1 ⁸	40	-	-	0.376	-
12.2 ⁸	70	-	-	-	-

- 1) sättigende Belichtungszeit, Belichtungsstufe I, Weißlicht (siehe C. 1.5)
- 2) Belichtung mit 550nm (grün), Belichtungsstufe I
- 3) Belichtung mit 600nm (orange), Belichtungsstufe I
- 4) Gesamtsignalhöhe Minimum/Maximum
- 5) Absorption der langwelligen Bande bei 612nm nach sättigender Belichtung
- 6) ΔE in Prozent der Extinktion des langwelligen Absorptionsmaximums
- 7) Proben aus Ansatz 2 (siehe Tabelle 12)
- 8) Proben aus Ansatz 3 (siehe Tabelle 12)
- Sh) Schulter

Die Photoreaktion ließ sich mit geringen Belichtungszeiten absättigen. Weitere Lichteinwirkung führte zu Ausbleichreaktionen der roten Bande, die das Signal der E/Z- Umwandlung überlagerten. Wurde statt mit Weißlicht mit Licht von 550/600nm bestrahlt, wurden die benötigten Einstrahlungszeiten wegen der reduzierten Beleuchtungsstärke länger. Die etwas niedrigeren $\Delta E/E$ - Werte wurden auf Ausbleichen zurückgeführt (Tabelle 15).

Daß Licht mit kürzerer und längerer Wellenlänge den gleichen Effekt wie Weißlicht (≈ 400 bis ≈ 700 nm, siehe C. 1.5) zeigte, war ein Hinweis dafür, daß eine Isomerisierungsreaktion auch beim proteingebundenen Chromophor des nativen Phycocyanins, im Gegensatz zu nativem Phytochrom oder partiell denaturiertem PC (OHAD et al., 1980; SIEBZEHNROBL, 1985), nur in eine Richtung, nämlich von E (trans) nach Z (cis) ablaufen kann.

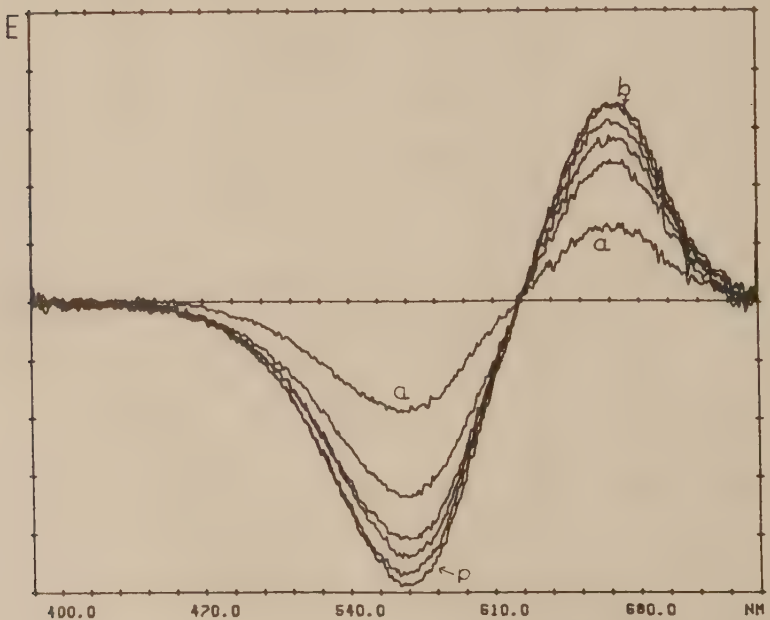
Abb. 47: Verhältnis der Signalhöhen von Abnahme/Zunahme im Differenzspektrum bei der E/Z- Photoumwandlung in Abhängigkeit vom pH- Wert des Mediums: +) denaturiert in 8M Harnstoffpuffer (0.1M KPP), • "nativ" in 0.1M Kaliumphosphatpuffer



Wurde der pH auf ≈ 3 abgesenkt, deutete das Absorptionsspektrum auf partiell protonierte Chromophore im PC hin. Das Maximum der langwelligen Bande wurde dabei im Vergleich zu neutralem pH um höchstens 2nm längerwellig verschoben, die Intensität ging jedoch deutlich zurück ($Q_{\max}/UV$ sank von 4 auf 1.8). Die Soretbande wurde dabei etwas schärfer ohne Maximum und Intensität stark zu ändern. Im Differenzspektrum drückte sich dies in einer Doppelbandenstruktur der langwelligen Zunahme aus (Abb. 46b). In diesem pH- Bereich waren bereits längere Belichtungszeiten zur Absättigung der Photoumwandlung notwendig.

Wurde der pH weiter abgesenkt, ähnelte die Struktur der Differenzbande dem mit Harnstoff denaturierten System (Abb. 48). Dem Minimum bei 577nm stand eine Zunahme bei 680 nm gegenüber, das Spektrum wurde wieder nahezu symmetrisch (Abb. 47). Auch die aus der Messung berechnete "Ausbeute" ($\Delta E/E$) der Umwandlung wurde gegenüber neutralen Bedingungen mehr als verdoppelt und näherte sich im Betrag fast den im Denaturierten gemessenen Werten (Tabelle 15).

Abb 48: Absorptionsspektrum von ZZZ/ZZE- PC minus ZZZ; belichtet mit Weißlicht (Belichtungsstufe I, siehe C. 1.5) in 0.1M KPP, pH=1.5: a) 10sec, b) 150sec hv

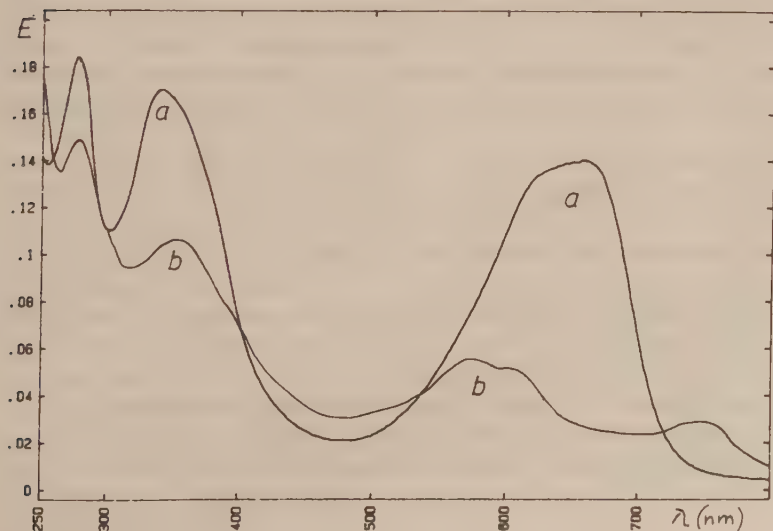


Das starke Ansäuern bewirkte neben der Protonierung der Chromophore wahrscheinlich ebenfalls eine partielle Denaturierung des Proteins. Das Absorptionsspektrum (Abb. 49a) zeigte jedoch Unterschiede zum Spektrum eines mit 8M Harnstoff denaturierten Kations (Abb. 43). Die langwellige Absorption besaß Doppelbandenstruktur (Maximum bei 662nm mit kurzwelliger Schulter), die Soretbande lag mit 340nm deutlich kürzerwelliger als in sauer denaturiertem PC. Der Quotient der langwelligen zur Soretbande betrug 0.8 bzw. 1.01. Bemerkenswert schienen auch die langen Belichtungszeiten, die, im Gegensatz zu sauer denaturierten Proben, zur Sättigung der E/Z- Photoreversion notwendig wurden (Tabelle 15, Abb. 48).

Hob man den pH in alkalische Bereiche, so waren ebenfalls Parallelen zum denaturierten System erkennbar. Ein pH von 12.2 bewirkte irreversible Änderungen der Proteinumgebung. Das Absorptionsspektrum zeigte Maxima bei 766nm (Anion), 585nm mit Schultern bei 630 und 535nm, 402nm sowie die Soretbande bei 354nm. Zugleich ging die Gesamttextinktion drastisch zurück. Rücktitration auf pH=7 führte zu keinem nativen PC- Spektrum, die Lösung erschien stark trüb durch Ausflocken des Proteins.

Belichtung im Alkalischen resultierte nur in indifferentem Ausbleichen über den ganzen Spektralbereich.

Abb. 49: Absorptionsspektren von belichtetem ZZZ/ZZE- PC in 0.1M KPP: a) pH=3 (180sec hv), b) pH=10.5 (220sec hv, Belichtungsstufe I, siehe C. 1.5)



In leicht basischer Umgebung ($\text{pH} \approx 10$) lag ebenfalls bereits das Absorptionsspektrum (Abb. 49b) von deprotonierten Chromophoren vor. Belichtung führte nur zu deutlichem Ausbleichen (18% in 20sec) bei 596/621nm (Abb. 46c). In diesem Stadium erwies sich aber das Protein nach Rücktitration mit Säure als voll nativ (gemessen am Absorptionsspektrum). Nach dem Ansäuern war ein deutlicher Rest- Photoeffekt von $\approx 5\%$ messbar (Tabelle 16).

Die "Ausbeute" an ZZE- Chromophoren im renaturierten PC war stark abhängig vom pH- Wert, bei dem $\Delta E/E$ bestimmt wurde. Da bei der Rückisomerisierung (ZZE nach ZZZ) im Neutralen relativ schnell eine Sättigung in der Reaktion eintrat, die Chromophore dabei auch sehr schnell auszubleichen begannen, war eine Aussage über die Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen aufgrund der Ausbeuten in neutralem Phosphatpuffer relativ schwierig. Der Wert lag im allgemeinen zwischen 20 und 30% des im sauren 8M Harnstoff gemessenen Anteils.

Um die Vollständigkeit der E/Z- Photoreaktion bei renaturierten PC- Isomeren zu testen, wurden ebenfalls (wie bei neutral harnstoff- denaturierten Isomerengemischen, siehe B. 2.2.2.1) Proben nach Belichtung im Neutralen angesäuert und erneut belichtet.

Tabelle 16: Bestimmung des bei höheren pH- Werten nicht isomerisierbaren ZZE- "Anteils" (vgl. Tabelle 15)

pH - Wert	ZZE- ⁻¹ Ausb.	pH - Wert	Belichtgs.-zeit (sec) ²	Differenz		Absorption	ZZE- ⁻¹ Ausb.
	(%)			Extrema	ΔE^3	$E\lambda_{\text{max}}^4$	(%)
7.8 ⁵	4.4	1.4	40	577/680	0.0013	0.093	1.4
10.5 ⁵	-	0.6	60	575/673	0.0044	0.045	0.0
7.5 ⁶	1.5	1.4	50	570/676	0.0026	0.122	2.1
10.1 ⁶	-	1.4	60	579/678	0.0013	0.241	5.2
12.2 ⁶	-	1.2	90	-	-	-	-

- 1) ΔE in % der Extinktion des langwelligen Absorptionsmaximums
- 2) sättigende Belichtungszeit, Belichtungsstufe I, Weißlicht (siehe C. 1.5)
- 3) Gesamtsignalhöhe Minimum/Maximum
- 4) Absorption der langwelligen Bande nach Belichtung
- 5) Proben aus Ansatz 2 (siehe Tabelle 12)
- 6) Proben aus Ansatz 3 (siehe Tabelle 12)

Wie bei denaturiertem PC war auch hier eine deutliche Steigerung der ZZE- "Ausbeute" ($\Delta E/E$) durch weitere Belichtung der bereits im neutralen bis leicht basischen Milieu bestrahlten und anschließend angesäuerten Isomerenmischung erkennbar.

2.2.3.2 Stabilität der Isomere

Vergleichbar zu den Konfigurationsisomeren bei denaturiertem PC, war auch im Nativen die Stabilität gegenüber anderen Einflüssen wie Aufbewahrungszeit, Temperatur, etc. interessant (Tabelle 17).

Für die Infrarotspektroskopie (siehe B. 1.3.3) mußten die Proben stark konzentriert werden, und durften deshalb kein oder nur Spuren von Salz enthalten. Wurden das ZZZ/ZZE- Isomere ngemisch gegen H_2O oder niedrig molaren (5mM, pH=7.1) KPP dialysiert, konnte ein deutlicher Rückgang seiner Photoaktivität beobachtet (70 bzw. 55% Verlust) werden. [Dieser Prozeß konnte nicht erklärt werden, da KPP ($\leq 0.1M$) normalerweise keinerlei Einfluß auf die E/Z- Photoisomerisierungsrate hatte. Da die 20- stündige Dialyse jedoch bei (relativ intensivem) Grünlicht durchgeführt wurde, könnte dies für die Rückreaktion verantwortlich gewesen sein.]

Eine größere Auswirkung könnten dagegen höhere Phosphatkonzentrationen auf die Isomere haben. Wurde PC in 0.1M KPP langsam eingefroren, das Salz also immer mehr aufkonzentriert, so zeigte die Probe nach dem Auftauen eine leichte Trübung; diese stammte von zum Teil irreversibel ausgefälltem Protein. (Kann durch Denaturierung/8M Harnstoff - Renaturierung/0.1M KPP wieder in Lösung gebracht werden und ergibt natives PC; FISCHER, 1986).

Nach (langsamem) Einfrieren (für 1 bzw. 4 Wochen) stellte man noch zu 75% Aktivität fest (nur bei neutralem pH, saure Proben zeigten keine Photoreaktion mehr).

Wurde das Isomere ngemisch (in 0.1M KPP) am Rotationsverdampfer (Wasserbadtemperatur ca. 30C) zur Trockene eingengt, Phosphat also ebenfalls aufkonzentriert, so betrug die Aktivität nach erneutem Lösen und Belichtung noch 85%.

Dagegen zeigt ZZE/ZZZ- PC Gemisch keinerlei Lichtreaktion, nachdem es (unter Grünlicht) im N_2 - Strom eingengt und in 5mM KPP, pH=7.1 resuspendiert wurde. (IR - Spektroskopie: Proben wurden als Glycerinfilm mit N_2 auf Küvettenfenster aufgetrocknet, siehe B. 1.3.2, 1.3.3).

Tabelle 17: Photoaktivität des ZZE/ZZZ- Gemisches unter verschiedenen äußeren Bedingungen

pH-Wert	Differenz		Absorption	ZZE-Ausb.	Art der Behandlung, (Belichtungszeit ²)
	Extrema (nm)	ΔE^3	$E\lambda_{max}^4$	gem. ¹ (%)	
1.9 ⁵	(572/679)	0.003	0.095	3.5	frisch nach Präparation (120sec)
7.5 ⁵	(574/629)	0.0057	0.288	2.0	frisch nach Präparation (60sec)
7.5 ⁵	-	-	0.59	-	mit N ₂ auf ein Drittel des Volumens/90min eingeblasen, (60sec)
7.5 ⁵	(579/634)	0.003	0.187	1.7	am Rotvap. (25C Wasserbad, dunkel) eingeeengt (80sec)
7.7 ⁵	(577/630)	0.004	0.21	1.5	1 Woche dunkel einfrieren (75sec)
7.7 ⁵	(592/633)	0.002	0.242	0.7	5 Tage dunkel, 8C (80sec)
6.3 ⁵	(587/628 679)	0.0014	0.19	0.6	gegen bid. H ₂ O dialysiert (80sec)
7.3 ⁵	(596/636)	0.0009	0.15	0.6	dialysiert, am Rotvap. eingeeengt (80sec)
6.8 ⁶	(565/623)	0.054	0.15	3.6	frisch nach Präparation (40sec)
7.3 ⁶	(573/628)	0.013	0.465	2.7	4 Wochen dunkel einfrieren (40sec)
7.3 ⁶	(570/628)	0.012	0.465	2.5	10min bei 45C im Wasserbad, dunkel, inkubiert (40sec)
7.3 ⁶	-	-	0.177	-	10min bei 80C im Wasserbad, dunkel, inkubiert (60sec)
7.0 ⁶	(573/629)	0.0008	0.054	1.6	dialysiert gegen 5mM KPP, 1 Woche einfrieren (60sec)
7.0 ⁶	(576/633)	0.033	2.445	1.4	wie vorher +10 Tage auf Eis/dunkel (120sec)
7.4 ⁶	(576/629)	0.022	0.528	4.2	wie vorher, 3 Wochen bei 8C/dunkel (40sec)

1) ΔE in % der Extinktion des langwelligen Absorptionsmaximums

2) sättigende Belichtungszeit, Belichtungsstufe I, Weißlicht (siehe C.1.5)

3) Gesamtsignalthöhe Minimum/Maximum

4) Absorption der langwelligen Bande nach sättigender Belichtung

5/6) Proben aus Ansatz 3/4 (siehe Tabelle 12)

Entsprechend konnte das Isomerengemisch auch längere Zeit ohne nennenswerte Rück- (Dunkel) Reaktion auf Eis gehalten werden. Die Aufbewahrung im Kühlfach war jedoch zeitlich begrenzt, da das Protein bei Temperaturen von 6-8°C ohne Zusatz von Azid von Proteasen angegriffen wurde. Die Phycocyaninlösung erschien dann trüb, das Absorptionsspektrum ähnelte dem bei partiell denaturiertem Protein. Der E/Z- Photoeffekt, durch die Stabilität im Neutralen begünstigt, schien dadurch größer zu werden, als gleich nach der Präparation (Tabelle 17).

Auch erhöhte Temperatur zeigte, solange das Protein nicht irreversibel geschädigt wurde (durch Inkubation bei 80°C), nur geringe Auswirkung auf die Photoaktivität (Tabelle 17).

2.2.4 Darstellung von ZZE- Isomeren bei der α - Untereinheit

Tabelle 18: Spektrale und biochemische Daten von PC, α - und β - UE

Molekulargewicht: nach SDS- Gel ¹		Aminosäuresequenz ²
α - UE:	16.9 KD	18.0 KD
β - UE:	18.5 KD	19.4 KD
daraus berechnet:		1) FISCHER et al. (1988)
PC - Monomer [α, β]:	35.5 KD	2) FRANK et al. (1978)
Trimer [α, β] ₃ :	106.5 KD	

Absorptionsmaxima	
PC [α, β]: 612nm, 350nm [α, β] ₃ : 618-620nm, 350nm	α - UE [α] ₂ : 616nm, 350nm β - UE [β] ₂ : 604nm, 350nm
PC - denaturiert (pH=7): 600nm, 354nm denaturiert/protoniert (pH=2): 662nm, 352nm	

Extinktionskoeffizienten (pro Chromophor)	
PC [α, β] nativ (pH=7) ³ :	99000cm ⁻¹ M ⁻¹
denaturiert, neutral (pH=7) ³ :	15400cm ⁻¹ M ⁻¹
denaturiert, protoniert (pH=2):	30000cm ⁻¹ M ⁻¹
α - UE [α] ₂ nativ (pH=7) ⁴ :	122000cm ⁻¹ M ⁻¹
β - UE [β] ₂ nativ (pH=7) ⁴ :	82000cm ⁻¹ M ⁻¹

3) KUFER (1980)
4) SAUER et al.
(1987)

Die α - UE von Phycocyanin trägt an ihrer Proteinkette nur einen Chromophor. Wenn die Z/E- Isomerisierung an allen drei Chromophoren gleichmäßig auftritt, sollte man eine ähnliche Photoisomerenausbeute wie im integralen PC erwarten. In vitro (0.1M KPP, pH neutral) liegt die isolierte, native α - UE (wie die β - UE) als Dimer (FISCHER et al., 1988) vor und absorbiert im Rotbereich geringfügig kürzerwellig als trimeres PC, die Soretbande bleibt unverschoben (Abb. 50/Tabelle 18). Wird das Protein der UE unter gleichzeitiger Monomerisierung entfaltet (8M Harnstoff), ist das Spektrum identisch zu denaturiertem PC sowohl bei neutralem ($\lambda_{max} = 600, 354\text{nm}$), als auch bei saurem pH ($\lambda_{max} = 662, 352\text{nm}$).

2.2.4.1 Reaktion mit Mercaptoethanol

Die mittels präparativer isoelektrischer Fokussierung (KÖST-REYES et al., 1987; siehe C. 2.1.9.2) isolierte α - Untereinheit wurde, analog zu integralem PC, mit 2- Mercaptoethanol umgesetzt (Konzentration der Probe begrenzt auf $E_{616} \approx 1.5$, sonst Ausfallen des Proteins, FISCHER, 1986).

Dazu wurde die in 0.1M KPP, pH=7 eingefroren aufbewahrte Untereinheitenlösung nach dem Auftauen im grünen Sicherheitslicht mit kristallinem Harnstoff (Endkonzentration 8M) denaturiert und im Eisbad mit 3.9 Vol. % Thiol ($57.2 \cdot 10^3$ Mol/Mol Chromophor; entsprach genau der Konzentration pro Chromophor, die bei PC zur höchsten ZZE- Ausbeute führte) umgesetzt.

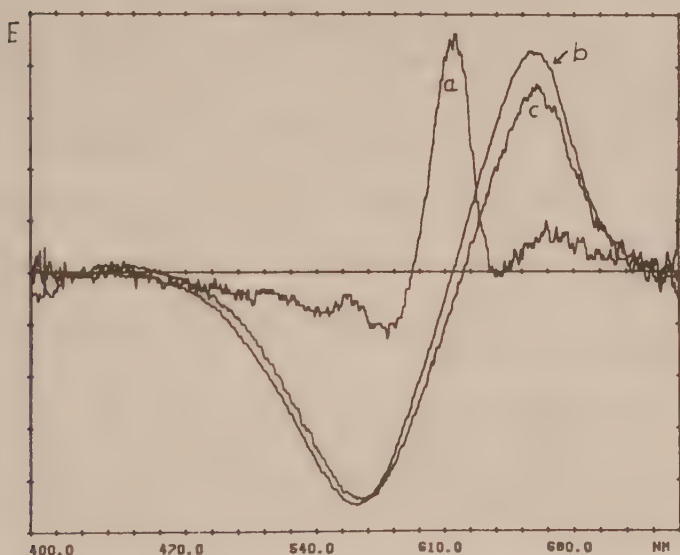
Sofort nach Zugabe des Thiols färbte sich die Lösung gelb ($\lambda_{max} = 411\text{nm}$). Das Mercaptoethanoladditionsprodukt wurde, wie für PC beschrieben (siehe B. 2.2.3) belichtet, mit HCl angesäuert und das Isomerengemisch durch zweistufige Säulenchromatographie gereinigt/renaturiert. Die Verluste während der Präparation blieben relativ gering, so konnten ca. 90% des ursprünglich eingesetzten Proteins nach Entfernung von Mercaptoethanol und noch ca. 50% nach Renaturierung festgestellt werden (spektroskopisch bei $\lambda = 276\text{nm}$ bestimmt).

2.2.4.2 Bestimmung des ZZE- Isomerenanteils

Die durch Absorptionsdifferenzmessungen im sauren Harnstoffpuffer ermittelte ZZE- Ausbeute ($\Delta E/E$) der modifizierten α - UE betrug 18% (Tabelle 19) und lag damit ähnlich wie bei integralem PC (17.7%). Das Absorptionsspektrum wies den ZZE-

Isomerenanteil ebenfalls nur durch die etwas ausgeprägtere kurzwellige Flanke aus, die bei Belichtung zurückging. Wiederum war beim reinen ZZZ- Produkt eine Intensitätszunahme bei 662nm und 352nm des reinen ZZZ- Isomers gegenüber dem ZZE/ZZZ- Gemisch feststellbar. Auch die Extrema der Differenzspektren (Abb. 49b) lagen bei nahezu denselben Wellenlängen (569, 665nm bei α - UE, 572, 665nm bei PC; $\text{pH} \approx 2.7$).

Abb. 49: Absorptionsdifferenzspektren ZZE/ZZZ minus ZZZ- UE (nach Weißlichtbestrahlung, Belichtungsstufe I, siehe C.1.5): a) α -UE nativ (0.1M KPP, $\text{pH}=7.4$, 40 sec hv), b) α - UE denaturiert (8M Harnstoffpuffer, $\text{pH}=2.5$, 40sec hv), c) β - UE denaturiert (8M Harnstoffpuffer, $\text{pH}=1.1$, 90sec hv)



Ähnliches Verhalten zeigte sich auch bei den Photoreaktionen nach Renaturierung. Die im Neutralen meßbare ZZE- "Ausbeute" ($\Delta E/E$) lag bei $\approx 2.7\%$ und betrug damit knapp ein Sechstel des im sauer denaturierenden Harnstoffpuffer festgestellten Prozentsatzes. Wurde die im neutralen KPP belichtete Probe angesäuert ($\text{pH}=1$), zeigte sich ein Resteffekt von 3.3% (nach 40sec, Extrema 569/680nm). Das Differenzspektrum von unbelichteter minus belichteter Probe wies, im Gegensatz zu den Differenzspektren der nativen, integralen ZZE/ZZZ- PC- Gemischen, eine Aufspaltung des Minimums bei neutralem pH auf (Abb. 49a, zum Vergleich: Abb. 46a).

Tabelle 19: ZZE- Isomerenausbeute von α - und β - Untereinheiten bei der Präparation über das C-10 Additionsprodukt

pH-Wert	Bel. zeit ¹	Differenz		Absorption	ZZE-Ausb.	
	(sec)	Extrema (nm)	ΔE^2	E_{max}^3	gem. ⁴ (%)	
2.8	15	569/665	0.0078	0.048	16.4	α -UE/den. ⁵
2.5	40	576/671	0.0352	0.196	18.0	
7.4	40	558/589/628	0.0068	0.256	2.7	α -UE/nat. ⁶
0.5	40	567/681	0.0024	0.078	3.0	
1.1	90	578/673	0.032	0.288	11.1	β -UE/den. ⁷

- 1) Sättigende Belichtungszeit, Belichtungsstufe I, Weißlicht (siehe C. 1.5)
- 2) Gesamtsignalhöhe Minimum/Maximum
- 3) Absorption der langwelligen Bande nach sättigender Belichtung
- 4) ΔE in % der Extinktion des langwelligen Absorptionsmaximums
- 5) 8M Harnstoffpuffer (enthält 0.1M KPP)
- 6) 0.1M KPP
- 7) 8M Harnstoffpuffer (enthält 0.1M KPP), mit Mercaptoethanol in der Meßlösung

Stärkeres Ansäuern führte jedoch auch bei der α - Untereinheit in harnstofffreiem Puffer zu kleineren $\Delta E/E$ - Werten, die vermutlich auf eine Beschleunigung der Rückreaktion durch die protonenkatalysierte Dunkelreversion zurückgeführt werden konnten.

2.2.5 Darstellung von ZZE- Isomeren bei der β - Untereinheit

Die beiden Chromophore an der nativen β - Untereinheit zeigen, obwohl strukturell identisch, sowohl spektroskopische Unterschiede, als auch Differenzen in ihrer Reaktionsfähigkeit (z.B gegen PCMS, Rot/Grün- Photochemie, Tabelle 20). Die β - UE liegt in vitro ebenfalls als Dimer vor (FISCHER et al., 1988, Tabelle 20). Ihre Absorption ist gegenüber integralem PC und der α - Untereinheit deutlich kürzerwellig verschoben ($\lambda_{max}=602nm$).

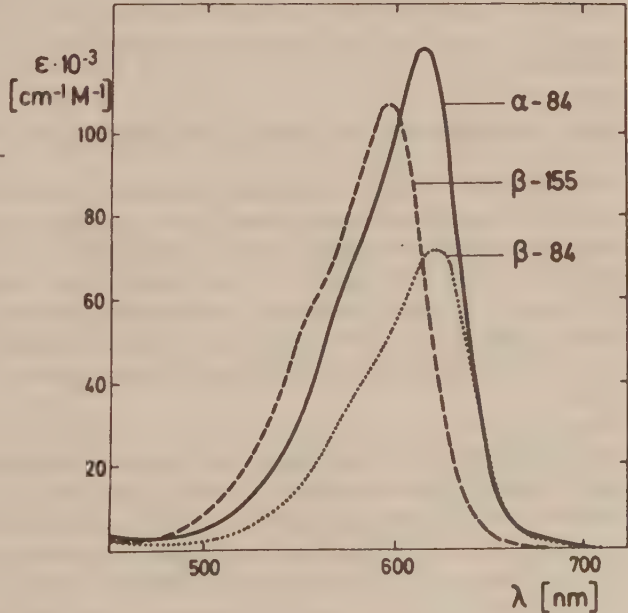
Tabelle 20: Besondere Eigenschaften der einzelnen Chromophore

	α_{84}	β_{84}	β_{155}
Absorption (λ_{max} , nm) ¹	616 - 618	622 - 624	598 - 600
Fluoreszenz ²	+	+	-
Optische Aktivität ³	+	-	+
reversible Photochemie ⁴	-	+	-
PCMS- Reaktion ⁵	-	+	-
Konfiguration	ZZZ	ZZZ	ZZE ⁶

- 1) Berechnet aus den Spektren der Untereinheiten, SAUER et al. (1987; siehe Abb. 50)
- 2) MIMURO et al., 1986
- 3) JOHN et al., 1985
- 4) Rot/Grün Photochemie (SIEBZEHRÜBL, 1985)
- 5) SIEBZEHRÜBL et al., 1987
- 6) Konfiguration liegt laut Röntgenstrukturdaten zwischen ZZZ und ZZE (SCHIRMER et al., 1986).

Abb. 50:

Chromophor-Einzelspektren bei PC, berechnet aus den Spektren der α - und β - UE (SAUER et al., 1987)



Das Untereinheitenspektrum lässt sich rechnerisch auflösen in die einzelnen Chromophorspektren (Abb. 50). Dabei liegen die Maxima für β_{84} bei ca. 624nm, für β_{155} bei 598nm (SAUER et

al., 1987) bzw. 592nm (MIMURO et al., 1986). In denaturierendem Milieu unterscheidet sich das Gesamtspektrum nicht von dem des PC's oder der α - UE.

2.2.5.1 Addition von Mercaptoethanol

Die Umsetzungs- und Belichtungsreaktionen der β - UE wurden analog denen der α - UE, jedoch nicht im präparativen Maßstab durchgeführt.

Die konzentrierte Proteinlösung in 0.1M KPP wurde dabei zu einer Lösung von 8M Harnstoffpuffer (enth. 0.1M KPP, pH=7.1) und 5.6 Vol. % Mercaptoethanol ($216.6 \cdot 10^3$ Mol/Mol Chromophore) gegeben. Es erfolgte wiederum ein sofortiger Farbumschlag nach Gelb ($\lambda_{max}=405nm$, Restabsorption bei 600nm).

Das Reaktionsgemisch wurde nach entsprechender Äquilibrierung im temperierten (12°C) Küvettenraum (siehe C. 1.4, ca. 25min) mit Weißlicht bestrahlt, wobei das Differenzsignal (Minimum 405nm, Maximum 464nm) auf eine geringfügige längerwellige Verschiebung (1-2nm) der Rubinoidbande hinwies. Durch Ansäuern mit HCl wurde das Thiol von C-10 eliminiert, verblieb aber während den weiteren Messungen in der Probe.

2.2.5.2 Bestimmung des ZZE- Isomerenanteils

Die Ausbeute (4E/E) von ZZE- Isomeren bei der Photokonversion im Rubinoidzustand wurde nur in sauer denaturiertem Zustand bestimmt (Tabelle 19). Er lag bei 11.1% und damit deutlich unter dem Anteil, der bei der α - UE sowie bei integralem PC gefunden wurde. (Die Anwesenheit von Mercaptoethanol in der β - UE- Lösung sollte in der Kürze des Meßintervalls noch keine negativen Auswirkungen auf die ZZE- Isomere haben.)

Die qualitativen Änderungen des Absorptionsspektrums bei der E/Z- Isomerisierung waren jedoch identisch zu α - UE und PC, auch das Differenzspektrum lag mit dem Minimum bei 578nm und dem Maximum bei 673nm nur leicht verschoben (Abb. 49c).

Die gemessene geringere ZZE- Ausbeute zusammen mit den unterschiedlichen sonstigen Eigenschaften der Chromophore gaben den Anlaß, die β - UE im nativen, teilweise "reduzierten" Zustand genauer zu untersuchen, um eine eventuell bevorzugte Z/E- Isomerisierbarkeit eines Chromophors zu ermitteln (siehe B. 2.3).

2.2.6 CD- Spektroskopie der ZZE/ZZZ- Isomerisierung von Phycocyanin

Die E/Z- Rückisomerisation bei renaturiertem PC hatte gezeigt, daß der ZZE- konfigurierte Chromophor bei neutralem pH- Wert gegenüber Belichtung im Vergleich zum denaturierten Zustand stabilisiert wurde (siehe B. 2.2.3.1), was durchaus von physiologischer Bedeutung für das Biliprotein sein könnte.

Wichtige Aussagen über die Struktur der Chromophore können aus dem Verhalten gegenüber polarisiertem Licht erhalten werden. Von den Photoisomeren (ΣP_{ir}) des 60kD Phytochroms sind große Verschiebungen der CD- Signale (bzw. Vorzeichenumkehr der langwelligen Bande) bei der Isomerisierung bekannt (BRANDLMEIER et al., 1981; THÖMLER, 1984).

In der Folge wurden CD- Spektren von nativem, trimeren Phycocyanin und modifizierten (siehe B. 2.2), renaturierten ZZE/ZZZ- PC- Isomeren verglichen, um den Einfluß der Konfigurationsänderung an einer Methinbrücke auf die gestreckte Konformation des Chromophors im nativen Proteins zu untersuchen.

Das CD- Spektrum eines renaturierten ZZE/ZZZ- PC Gemisches ($\Delta E/E$: 2.0%) in 0.1M KPP, $pH=7.5$ zeigte eine negative Bande bei $\lambda_{max}=345nm$, mit einer deutlichen Schulter auf der langwelligen Seite (Abb. 51a). Das Maximum des positiven Signals lag bei 601nm, die Bande wies sowohl kürzer- als auch längerwellig je eine, nur sehr leicht angedeutete, Schulter, auf. Wurde das Isomerengemisch sättigend mit Weißlicht bestrahlt, so ließ sich keinerlei Verschiebung des positiven und negativen Peaks beobachten. Dagegen ging die Intensität beider Banden etwas zurück (3-6%); ebenfalls zu beobachten war eine geringfügige Reduzierung der beiden Schultern am langwelligen Signal.

Da eine vollständige E/Z- Umwandlung unter nativen Bedingungen vermutlich nicht stattfand, mußte man auch in der belichteten Probe noch von einem Isomerengemisch (wenn auch mit sehr geringem ZZE- Anteil) ausgehen. Der intensive Meßstrahl des CD- Gerätes brachte eine 15- prozentige E/Z- Umwandlung, auch ohne Belichtung der Probe, während der Messung mit sich.

Das CD- Spektrum eines im denaturierten Zustand mit Mercaptoethanol behandelten, isomerisierten und renaturierten PC's zeigte jedoch deutliche Unterschiede zu PC, welches nach der

Isolation zwar lyophilisiert, sonst aber unbehandelt geblieben war (Abb. 51b). Gelöst in demselben neutralen KPP, ergab sich eine um 5nm kürzerwellige, negative Soretbande bei 340nm. Die positive Bande lag ebenfalls bei 601nm, wies aber eine ausgeprägte Schulter bei ca. 633nm auf.

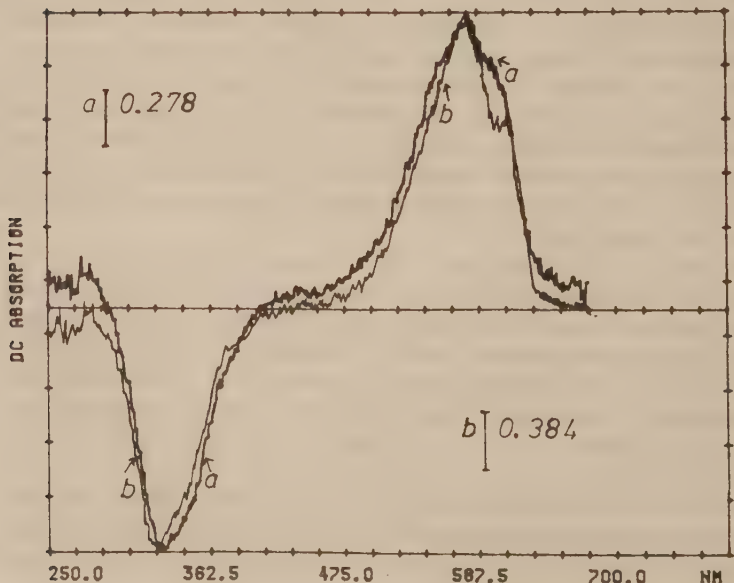
Die Anisotropie betrug $0.933E^{-3}$ gegenüber $0.708E^{-3}$ für das ZZZ/ZZE- PC Gemisch.

Es handelte sich dabei um das typische CD- Spektrum eines trimeren, linkerfreien PC's (JOHN, 1986).

Das Spektrum des ZZE/ZZZ- Gemisches dagegen ähnelte dem CD-Signal eines PC- Monomeren. Für den monomeren Aggregationszustand (erzeugt durch Zugabe von 1M Na- Rhodanid) wurde ein Minimum bei 342nm, ein Maximum bei 603nm, jedoch ohne Schulter, festgestellt (JOHN, 1986). Da das Absorptionsmaximum von Z/E- isomerisiertem PC ebenfalls immer etwas kürzerwellig verschoben gegenüber dem Trimeren (612nm bzw. 616nm) lag, wäre es möglich, daß durch den Ablauf der Isomerisierung auch durch anschließende Renaturierung nicht mehr vollständig der trimere Zustand erreicht würde.

Abb. 51: CD- Spektrum von integralem PC in 0.1M KPP, pH=7.5:

- a) ZZE/ZZZ- Isomerengemisch aus der Präparation über das Rubinoid (siehe C. 2.2.3),
- b) trimeres ZZZ- PC frisch nach Trennung über DEAE- Cellulose (siehe C. 2.1.9.1)



Um den Aggregatzustand zu prüfen, wurde von verschiedenen behandeltem PC ein S- Lauf (5 - 20% Saccharose in 0.1M KPP, pH=7.1, 24h) in der Ultrazentrifuge durchgeführt. Entsprechend ihrem Molekulargewicht wandern die PC- Aggregate unterschiedlich weit im Gradienten. Es wurden nur zwei Banden gefunden, eine dunkelblaue (Trimer) fast an der Basis des Zentrifugenglases, und eine hellblaue (Monomer) in der Mitte.

Tabelle 21: Aggregationszustände von PC, bestimmt nach ihren Sedimentationsgeschwindigkeiten

Behandlung	Monomer		Trimer	
	λ_{max} (nm)	Anteil (%)	λ_{max} (nm)	Anteil (%)
den./ren. ¹	612	50	614	50
dunkel lyoph. ²	611	6	614	94
hell lyoph. ³	611	11	615	89
nach Isolat. ⁴	610	3	614	97

- 1) PC in 0.1M KPP mit kristallinem Harnstoff denaturiert, renaturiert durch erschöpfende Dialyse gegen 0.1M KPP (pH=7.1)
- 2) Probe während der Gefriertrocknung dunkel gehalten
- 3) Gefriertrocknung unter Weißlicht (60 Watt, 15 Std.)
- 4) PC aus frischer Auftrennung über DEAE- Cellulose

Tabelle 21 zeigt, daß PC welches einmal den Zyklus Denaturierung/Renaturierung durchlaufen hatte, nur noch zu 50% aus Trimeren bestand. Es wäre also durchaus möglich, daß es durch die noch drastischere Einwirkung von Mercaptoethanol auf das Protein letztlich nach Isomerisierung und Renaturierung größtenteils (oder völlig) als Monomer vorlag, was sich in einer Änderung des CD- Signals bemerkbar machen würde. Im Gegensatz dazu hatte ein Lyophilisationsschritt, wie er in der Regel am Ende einer Präparation von linkerfreiem PC stand (siehe B. 2.1.9.1), solange er noch dazu im Dunklen ausgeführt wurde, wenig Einfluß auf trimeres PC. Durch Belichtung während der Gefriertrocknung wurde das Gleichgewicht etwas auf die Seite des Monomeren verschoben (siehe B. 2.4.2.1).

2.3 Z/E- Isomerisierung der α - und β - Untereinheit im harnstofffreien Milieu

2.3.1 Addition von Mercaptoethanol an native Biliproteine

Im Gegensatz zur Reduktion mit NaBH_4 und der Addition von Dithionit an C-10 der Phycocyaninchromophore (KUFER und SCHEER, 1979), ließ sich natives PC mit 2- Mercaptoethanol vollständig umsetzen. Die Reaktion erfolgte sowohl mit integralem PC (Abb. 52), als auch mit den getrennten α - und β -Untereinheiten.

Die Additionsreaktion wurde in 0.1M KPP (pH=7.4) bei grünem Sicherheitslicht und Raumtemperatur durchgeführt. Die Überschüsse an Reduktionsmittel lagen sehr viel höher als bei denaturiertem PC (Tabelle 12), da die Chromophore durch das native Protein geschützt werden. Ebenfalls war für die vollständige Addition an integrales PC sehr viel mehr Thiol nötig als für die separierten Untereinheiten (Tabelle 22). Dies deutete auch auf zusätzliche Stabilisierungseffekte des integralen Proteins hin.

Erstaunlicherweise benötigte die Anlagerung an die β - UE geringere molare Thiolüberschüsse als die α - UE, wobei jedoch die Addition, bezogen auf die Volumenanteile des Nucleophils in der Gesamtlösung, bei der β - UE langsamer verlief (gemessen am Rückgang von λ_{max}) als bei PC und der α - UE (Abb. 53).

Abb. 52: Titration von nativem, integralem PC in 0.1M KPP, pH=7.1 mit 2- Mercaptoethanol: a) vor, b) nach Zugabe von 31 Vol. % Nucleophil

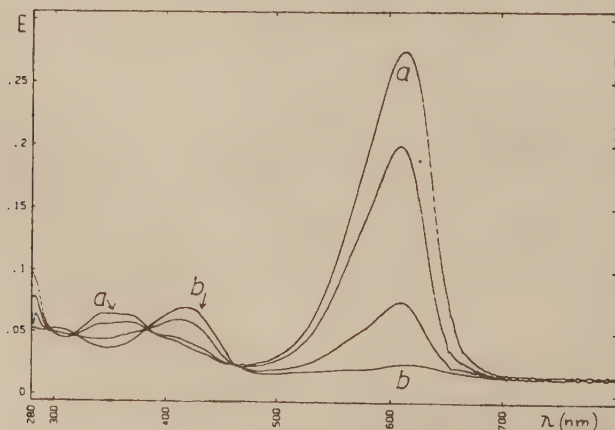
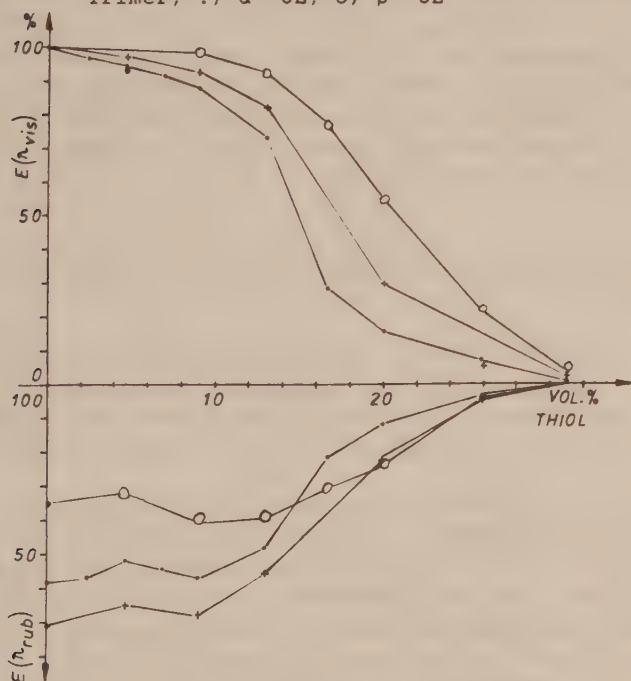


Tabelle 22: Vergleich der zur vollständigen Überführung in das Rubinoid notwendigen Mercaptoethanolkonzentrationen bei nicht- denaturiertem Protein

	PC-Trimer	α - UE	β - UE
$\epsilon\lambda_{max}$ ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)	891000	122000	164000
Chromophorkonzentration ($\mu\text{Mol/l}$)	0.290	2.065	2.56
Mercaptoethanol (Vol. %)	31	31	31
molarer Überschuß pro Chromophor	$22.24 \cdot E^6$	$3.12 \cdot E^6$	$2.52 \cdot E^6$

Abb. 53: Titration von Phycocyanin und seinen Untereinheiten in 0.1M KPP (pH=7.1) mit 2- Mercaptoethnol: +) PC-Trimer, .) α - UE, o) β - UE



Im Gegensatz dazu wurde zur Rubinoidbildung bei PC im neutralen 8M Harnstoffpuffer nur ca. 15Vol%, bzw. ein Überschuß von ca. $70 \cdot 10^3$ Mol Mercaptoethanol pro Mol Chromophor benötigt. Die Addition im nativen Zustand war, wie bei denaturiertem

riertem PC, durch Ansäuern voll reversibel, das Spektrum zeigte dann protonierte Chromophore. Man kann davon ausgehen, daß das Thiol, besonders in diesen Mengen, auf das Protein auch denaturierend wirkte. Das erkannte man auch daran, daß nicht die Konzentrationsverhältnisse Chromophor:Nucleophil, sondern die absoluten Volumenanteile Thiol in den Pigmentlösungen für die Rubinoidbildung ausschlaggebend waren (analog: 8M Harnstoffpuffer für Denaturierung).

Die Biliproteinlösungen konnten auch durch niedrigere Thiolkonzentrationen in einen partiell "reduzierten" Zustand versetzt werden; das Absorptionsspektrum zeigt dann ein Nebeneinander von Verdin und Rubinoidchromophoren an ("Phycocyanorubin", KUFER und SCHEER, 1979).

In diesem Zusammenhang könnte auch interessant werden, ob alle Chromophore im PC (bzw. auch in der β -UE) - obwohl strukturell identisch, doch durch ihre unterschiedliche Proteinumgebung verschieden reagierend (Tabelle 20) - gleichberechtigt vom Nucleophil angegriffen werden. Die Möglichkeit, daß nur ein Chromophor bei dem Versuch der Reduktion abreagiert, wurde bereits von KUFER (1980) in Betracht gezogen. Der Ablauf der Addition von Mercaptoethanol und die Photoreaktionen in diesen partiell "reduzierten" Zuständen ließen diese Möglichkeit ebenfalls offen.

2.3.2 Photoreaktionen der β -UE in partiell "reduziertem" Zustand

Wurde die β -Untereinheit in neutralem 0.1M KPP mit Mercaptoethanol titriert, konnte man, abhängig vom Grad der Anlagerung, bei Belichtung eine Reaktion beobachten, die von der Wellenlänge des eingestrahltten Lichtes abhängig zu sein schien.

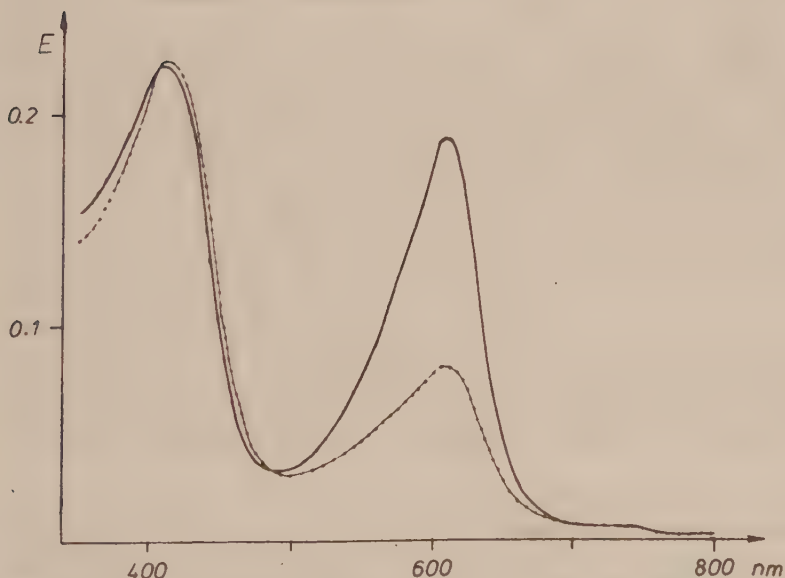
Der Ablauf dieser Photoumwandlung wies qualitative Ähnlichkeiten zu Photoreaktionen an partiell mit Harnstoff denaturiertem Phycocyanin bzw. seinen Untereinheiten auf, die bei Belichtung eine, zum Teil reversible, Rot/Grün-Photoreaktion zeigen (SIEBZEHNROBL, 1985; siehe B. 2.3.7).

Wurde partiell "reduzierte" β -UE mit Licht von 600nm (Orange, siehe C. 1.5) bestrahlt, d. h. Einstrahlung im langwelligen Absorptionsmaximum, so wurde ein deutlicher Rückgang der Extinktion beobachtet, ohne daß sich gleichzeitig das Absorptionsmaximum merklich verschob (Abb. 54). Die Intensi-

tät der Rubinoidbande blieb nahezu unverändert und verschob sich nur 2-3nm längerwellig.

Nach Ansäuern (Eliminierung des Thiols) und Denaturieren erhielt man das Absorptionsspektrum eines denaturierten Kations. Bei erneuter Bestrahlung mit Weißlicht zeigte das Differenzspektrum (Abb. 55b) von unbelichteter minus belichteter Probe eine Absorptionsabnahme bei 575nm sowie eine Zunahme bei 670nm. Das Spektrum war damit qualitativ identisch zu denen, die man erhielt, wenn die β - UE mit einer Mischung von, im harnstoff- denaturierten Rubinoidzustand präparierten, ZZE/ZZZ- Chromophoren (siehe B. 2.3) rückisomerisiert wurde (Abb. 49c).

Abb. 54: Absorptionsspektrum der β - UE in partiell "reduziertem" Zustand (in 0.1M KPP, pH=7.1, 20Vol.% Mercaptoethanol): (—) vor, (---) nach neun Minuten Orangelichtbestrahlung (600nm, Belichtungsstufe I, siehe C. 1.5)

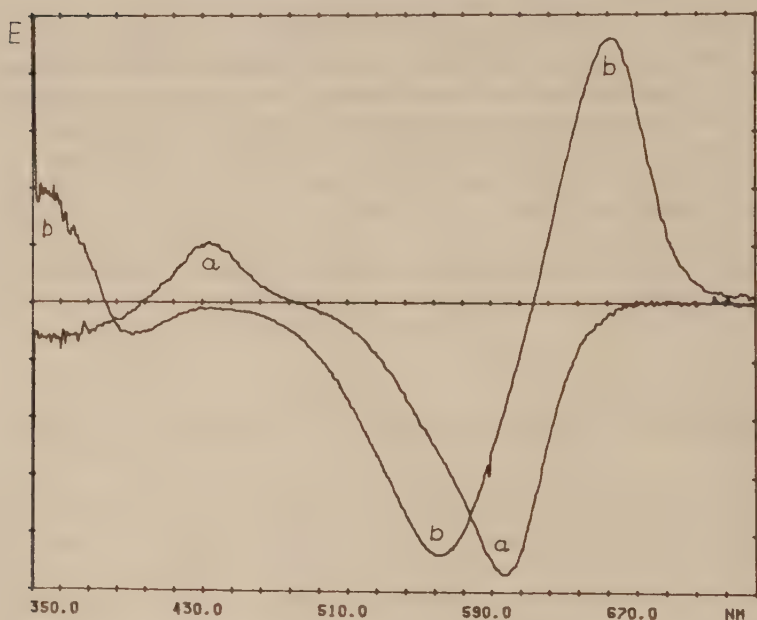


Verfuhr man analog mit einer Probe (gleiche Ausgangsextinktion), welche im partiell "reduzierten" unbelichtet geblieben war, zeigte diese nach Ansäuern, Denaturieren und Belichten ebenfalls keinerlei Photoeffekt. Dabei waren jedoch die Extinktionen beider Ansätze nach Abschluß der Belichtung im sauer denaturierten Zustand identisch. Das bedeutete also, daß der Rückgang der Intensität bei Belichtung des par-

tiell "reduzierten" Pigments auf eine echte Photoumwandlung, und nicht auf einen irreversiblen Ausbleicheffekt durch die langen Belichtungszeiten zurückzuführen war. Es bedeutete zudem, daß es sich bei dieser Reaktion um eine Isomerisierung von ZZZ nach ZZE, vergleichbar der Belichtung der denaturierten Rubinoide, handeln könnte.

Abb. 55: Absorptionsdifferenzspektren bei der Präparation von Konfigurationsisomeren der β - UE in 0.1M KPP in partiell "reduziertem" Zustand:

- a) Hinreaktion (ZZZ minus ZZE, siehe B. 2.3.2.1),
- b) Rückreaktion (ZZE minus ZZZ, siehe B. 2.3.2.2)



2.3.2.1 Z/E- Isomerisierung

Zur Erklärung des Extinktionsrückganges im roten Spektralbereich bei Belichtung des partiell "reduzierten" Zustandes (Abb. 54) mußten mehrere Möglichkeiten in Betracht gezogen werden:

- a) Die Absorption bleicht durch Schädigung der Chromophore irreversibel aus;
- b) die Absorption bleicht reversibel aus, da ein gebildetes

- Isomeres (ZZE ?) aufgrund seiner Struktur vom Protein weniger beeinflusst wird und deshalb einen viel niedrigeren Extinktionskoeffizienten als das Edukt hat;
- c) die Belichtung führt zu einer vermehrten Addition des Nucleophils unter Bildung des (Z-Z) Rubinoids mit nachfolgender Isomerisierung;
 - d) die Belichtung führt zu einer direkten Z/E- Isomerisierung des Verdinchromophors, wobei das ZZE- Isomere möglicherweise leichter Thiol addiert.

Der beobachtete deutliche Rückgang der langwelligen Absorption ($> 50\%$) fand nur unter Licht statt (Tabelle 23a), wobei ein reiner Ausbleicheffekt jedoch ausgeschlossen werden konnte (vgl. a; siehe B. 2.3.2).

Eine Dunkelreaktion durch fortschreitende Umwandlung des Verdin- in den Rubinoidchromophor konnte dabei nicht völlig ausgeschlossen werden; sie läuft aber auf alle Fälle viel langsamer als die, bei der Belichtung beobachtete, Reaktion ab.

Sowohl die Addition von Mercaptoethanol an natives und denaturiertes PC oder an DHOEBV, als auch die Reduktion von denaturiertem PC mit NaBH_4 hatte gezeigt, daß diese Reaktionen sehr schnell ablaufen. Vor allem bei derartig hohen Thiolüberschüssen erfolgte ein plötzlicher Farbumschlag von Blau nach Gelb. Bei geringeren Konzentrationen war die Reaktion ebenfalls binnen wenigen Minuten zum Stillstand gekommen. Das Absorptionsspektrum zeigte auch nach längerem Warten nur minimale Änderungen, die jedoch auch z.B. von geringen Temperaturänderungen ausgelöst werden können.

Auch KUFER und SCHEER (1979) geben an, daß bei der Titration von denaturiertem PC mit größeren molaren Überschüssen an Reduktionsmittel die Reaktion lediglich beschleunigt wird, ohne aber die Chromophore in stärkerem Umfang zu reduzieren.

Da die teilweise "reduzierte" Proteinlösung durch den hohen Volumenanteil an Mercaptoethanol sehr empfindlich auf Temperaturschwankungen reagierte, was sich in deutlichen Intensitätsänderungen der Absorption bemerkbar machte, wurden lange Äquilibrierungszeiten im auf 12°C temperierten Küvettenraum des ZWS notwendig (siehe C. 1.4), um eine stabile Grundlinie zu erhalten. Zudem wurde immer gegen eine unbelichtete, sonst aber wie die Meßlösung behandelte, Referenz gemessen. Das Differenzspektrum (Abb. 55a) mußte damit ausschließlich auf die Bestrahlung zurückgehen.

Gleichzeitig zu der starken Intensitätsabnahme bei 609nm, nahm die Extinktion der Rubinoidbande nur geringfügig zu und bei längeren Belichtungszeiten sogar wieder ab (Tabelle 23a).

Unter Verwendung der Extinktionskoeffizienten für das Phycorubin bei denaturiertem PC aus Spirulina platensis (KUFER, 1980) von $23300 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pro Chromophor, sowie von 82000 pro Chromophor für native β -UE, wurden, spektroskopisch gesehen, mehr Mol Chromophore durch die langwellige Belichtung "abgebaut", als neu als Rubinoid entstanden.

Wenn man davon ausging, daß das Protein durch Mercaptoethanol auch partiell denaturiert wurde, mußte man auch annehmen, daß der Extinktionskoeffizient für die langwellige Bande nicht mehr mit 82000 pro Chromophor, sondern sehr viel niedriger veranschlagt werden mußte (vgl. PC nativ zu PC denaturiert = 99000 zu $15400 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pro Chromophor).

Das würde aber die Menge der scheinbar "abgebauten" Chromophore noch mehr erhöhen. Aus diesen Kalkulationen folgte jedoch, daß nur ein Bruchteil der Chromophore durch reine Mercaptoethanolanlagerung (wie sie auch im Dunkeln ablaufen würde) in Rubinoidchromophore umgewandelt werden konnte. Der größere Teil wurde einer Lichtreaktion unterworfen, von der aus der anschließenden Belichtung im sauer denaturierten Zustand geschlossen werden konnte, daß es sich um eine Isomerisierung an C-15 handelte.

Die Erhöhung des Rubinoidpeaks könnte dann auch so interpretiert werden, daß ZZE- isomerisierte Chromophore dem Angriff von Mercaptoethanol leichter zugänglich wären. Eine entsprechende Beobachtung wurde z.B. auch bei Modellchromophoren gemacht. Wurde das Thiol um die Ausbeute nicht zu schmälern in geringeren Mengen zugesetzt, d. h. war die Ausgangslösung noch leicht blaugrün bis grüngelb gefärbt (Restabsorption im Rotbereich $\approx 5\%$), so war diese nach Weißlichtbestrahlung rein gelb (Restabsorption bei $\approx 600\text{nm} = 0$).

Nicht erklärt werden konnte die Beobachtung, daß die Abnahme im Differenzspektrum bei 612nm viel größer war als die Abnahme im Maximum der langwelligen Bande bei 608nm im Absorptionsspektrum (Tabelle 23a/4). Auch zeigte das Differenzspektrum (Abb. 55a) eine "flach" auslaufende, kurzwellige Flanke mit einer schwach angedeuteten Schulter. Dies könnte ein möglicher Hinweis dafür sein, daß im Spektrum zwei unterschiedliche Prozesse überlagert wurden.

Wenn man davon ausgehen wollte, daß es sich um eine Z/E-Isomerisierung handelt, so sollte man erwarten, daß kürzer-

wellige Produkte neu entstehen und dies im Spektrum auch sichtbar wird. Zu sehen war im Absorptionsspektrum (Abb. 54) jedoch nur eine drastische Abnahme der Intensitäten im roten Spektralbereich um 57% gegenüber dem unbelichteten Spektrum verbunden mit einer leichten hypsochromen Verschiebung um 2-3nm, im Differenzspektrum nur eine Abnahme im Langwelligen, jedoch keine Zunahme in der kurzwelligen Flanke um 580nm (Abb. 55a).

Vergleich man dazu die Rückisomerisierungsspektren von ZZE nach ZZZ bei nativem PC aus der Präparation (Abb. 46a), so wurde dabei deutlich, daß die Abnahme bei 575nm einer sehr viel höheren Zunahme bei 629nm entsprach. Das umgekehrte Spektrum würde man für die Z/E- Reaktion erwarten. Dies sprach aber wiederum dafür, daß sich zwei Reaktionen überlappen: eine in geringem Umfang weitergeführte Addition, ev. gefördert durch Belichtung, sowie die Z/E- Isomerisierung, wobei die geringe Zunahme im Spektrum im Kurzwelligen auch durch die gleichzeitige, wenn auch geringe, Verschiebung des Maximums nicht deutlich hervortrat.

Ein sehr ähnliches Spektrum wurde auch bei der reversiblen Rot/Grün- Photochemie an partiell denaturiertem PC, bzw. seiner β - UE erhalten (SIEBZEHNROBL, 1985). Auch hier ging man davon aus, daß bei Belichtung der Chromophore in 5M Harnstoff bei neutralem pH mit Rotlicht (650nm) eine ZZZ/ ZZE- Umwandlung eintrat. Für diesen Fall wurde eine starke Absorptionsabnahme bei 609 nm, sowie eine geringe Zunahme (6% der Abnahme) bei ca. 500nm festgestellt.

2.3.2.2 E/Z- Isomerisierung

Wurde die, mit 22.7 Vol.% Mercaptoethanol partiell "reduzierte" (und denaturierte) Probe nach Belichtung angesäuert, um Mercaptoethanol zu eliminieren, und anschließend durch Zugabe von festem Harnstoff (8M) denaturiert, so erhielt man ein Absorptionsspektrum mit einem relativ breiten plateauartigen Maximum ($\lambda_{max} \approx 640nm$, Abb. 56a).

(Bei umgekehrtem Vorgehen - zuerst denaturieren, dann ansäuern - erfolgte ein sofortiger Farbumschlag nach Gelb beim Einbringen des Harnstoffs, da im Denaturierten die Addition bereits bei niedrigeren Mercaptoethanolkonzentrationen vollständig ablief; führte zur Ausbeuteverringerung um ca. 25% an ZZE- Isomeren!).

Tabelle 23: Spektroskopische Daten zur Photokonversion von
partiell "reduzierter" β - UE

a) Hinreaktion (Z/E- Isomerisierung) in neutralem, 0.1M KPP

Nr.	β - UE (nM)	Thiol (Vol%)	Belichtg. (min/nm)	Differenz! ($E\lambda_{rub,rot}$)	($E\lambda_{rub,rot}$ vor nach Belichtung)	Absorption ² nach Belichtung
1a	13.2	11.4	5/600	0.015439/0.086609	0.175404/0.527606	0.183404/0.439606
b	13.2	11.4	5/600	n.b.	n.b.	n.b.
c	13.2	11.4	5/430	n.b.	n.b.	n.b.
d	13.2	11.4	5/430	n.b.	n.b.	n.b.
2	12.2	21.6	9/600	n.b.	0.152411/0.194608	n.b.
3a	13.2	22.7	4/430	0.005445/0.021611	0.184412/0.256609	0.185412/0.258609
b	13.2	22.7	dunkel	-	n.b.	n.b.
4a	13.2	22.7	9/600	0.035444/0.191611	0.219412/0.186608	0.222414/0.088008
b	13.2	22.7	dunkel	-	0.219412/0.186608	n.b.
5a	13.2	22.7	5/430	0.008449/0.038614	0.201411/0.186009	0.204112/0.146609
b	13.2	22.7	5/600	n.b.	n.b.	n.b.
6	49.3	23.8	10/600	n.b.	0.41410 /0.645608	0.446416/0.283609
7a	13.2	25.0	7/600	0.030446/0.164611	0.235410/0.083606	0.225411/0.057607
b	13.2	25.0	7/600	n.b.	n.b.	n.b.
c	13.2	25.0	7/430	n.b.	n.b.	n.b.
8a	12.3	17.1	15/600	n.b.	n.b.	n.b.
b	12.3	17.1	15/600	n.b.	n.b.	n.b.
c	12.3	17.1	13/600	0.027442/0.163612	0.176402/0.293607	0.175408/0.225607
c'			+10/550	0.017440/0.118611	0.175408/0.225607	0.174408/0.24607
9a	13.1	22.7	5/600	0.028446/0.162611	0.21409 /0.091607	0.204410/0.063609
a'			+ 4/550	0.022449/0.127611	0.204410/0.063609	0.202410/0.07609
b'	13.1	22.7	6/600	n.b.	0.21409 /0.091607	0.19410 /0.053607
b'			+ 8/528	n.b.	0.19410 /0.053607	0.192410/0.065610

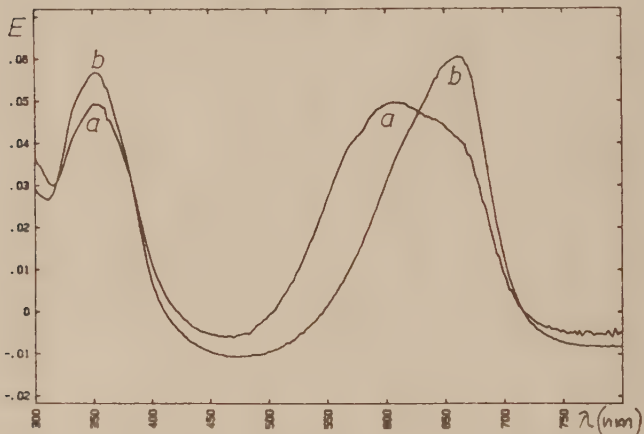
Tabelle 23: b) Rückreaktion (E/Z- Isomerisierung) in saurem Harnstoffpuffer

Nr.	pH-Wert	Belichtg. (sec/nm) ³	Extrema (nm)	Diff. ΔE^4	Absorpt. ⁵ $E_{\lambda \max}$	vor nach Bel. $E_{\lambda \max}$	E- Gehalt gem ⁶ kor ⁷
1a	1.75	90/weiß	579/674	0.0285	0.157 ₆₆₀	0.168 ₆₆₂	16.9
b	1.75	120/600	575/671	0.0265	n.b.	0.168 ₆₆₂	15.8
c	1.8	120/weiß	577/673	0.0126	0.16 ₆₅₈	0.165 ₆₆₁	7.6
d	1.8	120/628	577/671	0.0107	n.b.	0.162 ₆₆₂	6.6
2 ⁸	2.0	60/weiß	573/668	0.048	0.055 ₆₀₇ /Sh ₆₅₀	0.07 ₆₆₂	69.0 ⁹
3a ¹⁰	2.0	60/weiß	577/671	0.0162	0.162 ₆₆₀	0.175 ₆₆₁	9.3
b ¹⁰	2.0	100/weiß	n.b.	n.b.	0.128 ₆₆₁	0.128 ₆₆₁	n.b.
4a	1.8	60/weiß	576/671	0.0693	n.b.	0.165 ₆₆₀	42.0
b	1.8	60/weiß	n.b.	n.b.	n.b.	0.165 ₆₆₀	n.b.
5a	1.8	90/weiß	575/670	0.019	0.147 ₆₅₈	0.158 ₆₆₂	12.5
b	1.8	90/weiß	577/672	0.063	Sh ₆₁₅ /0.11 ₆₄₈	0.139 ₆₆₀	45.1
6 ⁸	2.0	60/weiß	575/666	0.194	Sh ₆₁₃ /0.34 ₆₅₁	0.42 ₆₆₀	51.0 ⁸
7a	1.8	120/weiß	576/677	0.061	Sh ₆₁₅ /0.138 ₆₅₄	0.163 ₆₆₁	37.2
b	1.8	120/370	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
c	1.8	120/weiß	575/672	0.0315	0.137 ₆₅₈	0.151 ₆₆₁	20.9
8a	1.8	240/weiß	577/671	0.0563	Sh ₆₁₅ /0.125 ₆₅₆	0.147 ₆₆₁	38.8
b	1.8	600/528	575/671	0.0549	n.b.	0.143 ₆₆₀	38.4
c	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
9a	1.7	120/weiß	577/672	0.0329	Sh ₆₂₀ /0.13 ₆₅₆	0.143 ₆₆₂	23.0
b	1.7	120/weiß	578/672	0.037	Sh ₆₂₀ /0.11 ₆₅₅	0.134 ₆₆₀	27.4

- 1) Zu- Abnahme im Differenzspektrum der partiell "reduzierten" β - UE (siehe Abb. 55a)
- 2) Absorption vor/nach Belichtung der partiell "reduzierten" β - UE
- 3) sättigende Belichtungszeit, Belichtungsstufe I (siehe C. 1.5)

- 4) Gesamtsignalhöhe Minimum/Maximum (Differenzspektrum nach Ansäuern, Denaturieren, siehe Abb. 55b)
 - 5) Absorption des langwelligen Maximums vor/nach Belichtung
 - 6) ZZE- Ausbeute: ΔE in % des langwelligen Absorptionsmaximums nach sättigender Belichtung
 - 7) absoluter ZZE- Anteil nach Korrektur (siehe C. 2.2.3)
 - 8) Reaktion bei Raumtemperatur durchgeführt
 - 9) ohne Mercaptoethanol in der Meßlösung
 - 10) Probe nach Hinreaktion erst denaturiert, dann angesäuert
-

Abb. 56: β - UE mit ZZE/ZZZ- Chromophoren in 8M Harnstoffpuffer (0.1M KPP, pH=2.05) nach Präparation in partiell "reduziertem" Zustand: a) vor, b) nach Weißlichtbestrahlung (ZZZ)



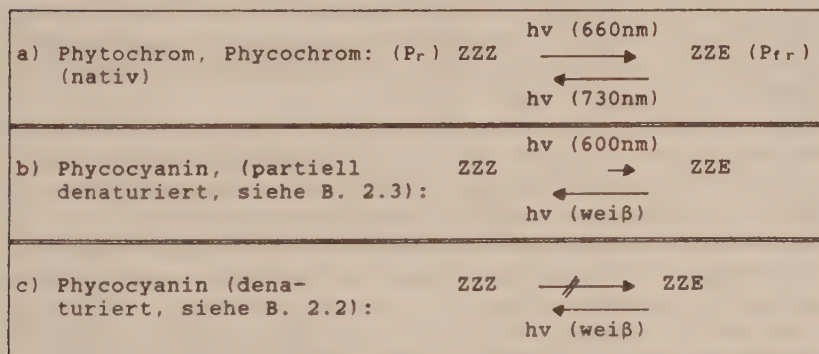
Dieses war im Idealfall aufgelöst in ein Maximum mit Absorption bei 607nm mit einer ausgeprägten Schulter um 650nm (Tabelle 23b/2). Durch Belichtung mit Weißlicht erhielt man das typische Spektrum des denaturierten Kations mit $\lambda_{\text{max}} \approx 660\text{nm}$ (Abb. 56b). Die Änderung zeigte sich deutlich in einer Verschmälerung der Bande durch starken Rückgang der kurzwelligen Flanke (vergleichbar, aber viel stärker als bei präparierten ZZE- Isomeren, siehe B. 2.2.3) bei $\approx 600\text{nm}$, sowie in einer Intensitätssteigerung bei 660nm. Zugleich wurde ein Anstieg der Soretbande beobachtet, das Maximum bei 354nm blieb unverändert. Die Photoreaktion konnte mit dem Auge verfolgt werden, die Farbe ändert sich deutlich von Blau (ZZE) nach Blaugrün (ZZZ). Im Differenzspektrum zeigte sich eine Abnahme bei 575nm sowie eine Zunahme bei 673nm, außer-

dem eine geringe Zunahme bei 350nm. Das Differenzsignal war wie bei ZZE/ZZZ- PC, präpariert über den Rubinoidweg, nahezu symmetrisch (Abb. 44, 55b).

Das Intensitätsverhältnis der Abnahme zur Zunahme war gleich eins, das Verhältnis der Halbwertsbreiten der Abnahme zur Zunahme ca. 1.6 (was das Verschwinden der kurzwelligen Flanke beschreibt). Dieses Differenzspektrum war identisch dem präparativ dargestellten ZZE/ZZZ- PC- Gemisch, welches im sauer denaturierten Zustand rückisomerisiert wurde, und ebenfalls analog zur E/Z- Isomerisierung bei PC- Peptiden.

Die Rückreaktion verlief am effektivsten mit Weißlicht. Jedoch auch Bestrahlung mit grün/rot (Tabelle 23a/1d, 8b) ergab nahezu identische Effekte. Die Absorption von ZZZ- und ZZE- Chromophor überlappt zwar in einem großen Wellenlängenbereich, die Isomerisierung kann jedoch bei Verdinen nur zum stabilen ZZZ- Zustand hin erfolgen (Schema 3, 9c).

Schema 9: Wege der Isomerisierung bei Phytochrom und Phycocyanin



Den interessantesten Punkt bei dieser Präparationsmethode stellte jedoch die Ausbeute an ZZE- Isomeren dar.

Wurde bei der Isomerisierung durch Licht während der Lyophilisation (siehe B. 2.4.2.1) maximale Ausbeuten von 5% bestimmt, bei der Präparation von ZZE- PC über den Rubinoidweg (siehe B. 2.2.2) 17% erreicht (zum Vergleich PC Peptide $\approx$ 20%, THÜMLER und RÖDIGER, 1983), so lag jetzt der Anteil bei mehr als 45% isomerisierter Chromophore.

Wurde vor der E/Z- Rückreaktion Mercaptoethanol über eine Gelfiltration (siehe B. 2.2.1) aus dem Reaktionsgemisch ent-

fernt, konnte eine Anreicherung bis zu 69% ZZE erreicht werden (Tabelle 23b/2). Dieser Wert wurde auf einerseits optimale Reaktionsbedingungen, andererseits auf eine möglicherweise erhöhte Stabilität des ZZE- Konformeren im thioalfreien Milieu (wie es auch im denaturierten Zustand der Fall war) zurückzuführen.

Wenn für das ZZE- ein viel niedrigerer Extinktionskoeffizient angenommen wurde als für das ZZZ- Isomer, und man außerdem von vergleichbaren Quantenausbeuten bei Belichtung des Edukts (ZZZ/ZZE- Gemisch) ausging, konnte man auf eine deutliche Verschiebung des Photogleichgewichts auf die Seite des ZZE- Konformeren schließen (Schema 9b).

2.3.3 Abhängigkeit der Z/E- Isomerisierung von der einstrahlten Wellenlänge

Die Belichtung der partiell mit Mercaptoethanol umgesetzten β - UE mit 600nm führte zu einer sehr großen Isomerisationsrate.

Strahlte man hingegen in die Rubinbande des Gemisches mit 430nm ein, so betrug die Ausbeute nur etwa ein Viertel dessen (Tabelle 23/1a, c). Sie konnte quantitativ mit dem ZZE- Anteil aus der Belichtung des Rubinoids in 8M Harnstoff (siehe B. 2.2) verglichen werden.

Man kann davon ausgehen, daß die Z/E- Isomerisierung im partiell "reduzierten" Zustand in neutralem Phosphatpuffer mit Blaulicht über den gleichen Mechanismus verläuft, wie im vollständig denaturierten Rubinoid mit Weißlicht. Der Verdinchromophor (Maximum bei 612nm) verfügt über eine endliche Absorption im Rubin- Bereich, die Absorption des Rubinoids (Maximum bei 412nm) im Verdin- Bereich ist jedoch vernachlässigbar. Bei der Entfernung der Maxima, sowie der Halbwertsbreite der verwendeten Filter (ca. 10nm, Tabelle 34), kann ausgeschlossen werden, daß bei Einstrahlung von Blaulicht Verdin- und Rubin- Chromophore gleichzeitig angeregt werden.

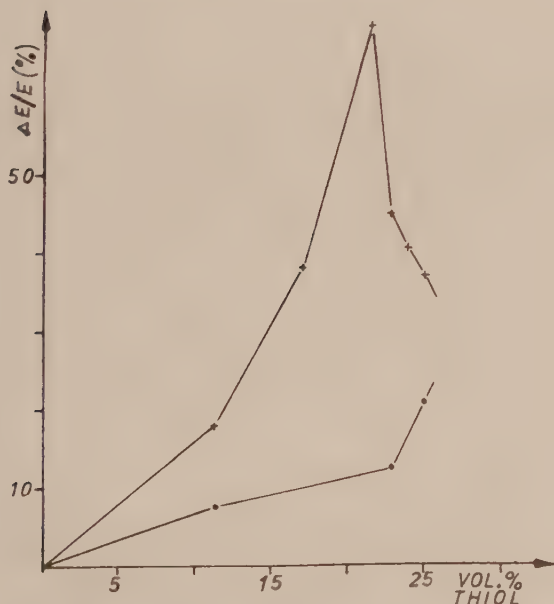
Die Ausbeutesteigerung bei Belichtung mit Orangelicht verläuft hingegen mit ziemlicher Sicherheit nicht über den Rubin- sondern über den Verdin- Chromophor.

2.3.4 Abhängigkeit der Z/E- Isomerisierung vom Grad der Mercaptoethanolanlagerung

Die Präparationsansätze im mit 8M Harnstoff denaturierten System hatten gezeigt (für PC allgemein), daß die Ausbeute an ZZE- Isomeren um so größer war, je vollständiger die Anlagerung des Nucleophils abgelief. Bei dem Reaktionsweg über das Rubinoid war dies auch zu erwarten.

Es war nun interessant zu wissen, inwieweit der Grad der Anlagerung an Chromophore im nativen Protein die Ausbeute veränderte. Besitzt Mercaptoethanol nur eine Art Katalysatorfunktion, d. h. reichen bereits geringe Mengen aus, um das Protein so zu beeinflussen, daß der Chromophor photoisomerisierbar wird?

Abb. 57: Abhängigkeit der ZZE- Isomerenausbeute bei der nativen β - Untereinheit vom Grad der 2- Mercaptoethanolanlagerung bei Bestrahlung mit:
+) 600nm, .) 430nm Licht



Um diese Frage zu klären, wurde β - UE mit verschiedenen Volumenanteilen Mercaptoethanol umgesetzt und mit 600 bzw. 430nm belichtet (Abb. 57).

Bei Zugabe von 11.4 Vol.% Thiol (Tabelle 23/1a) ergab Belichtung mit 600nm eine ZZE- Ausbeute ($\Delta E/E$) von rund 17%.

Bei dieser Mercaptoethanolmenge erschien die Rubinbande nur als langwellige Schulter in der Soret-Absorption. Belichtung mit Orange führte zum Rückgang der Absorption bei 606nm (16.7%), die Rubinbande nahm zu (4.5%) und erschien dann mit der Soretbande als Doppelpeak. Zu- und Abnahme im Differenzspektrum (439/609nm) addierten sich mit der Absorption zu den unbelichteten Werten. Das Differenzsignal konnte jedoch nicht von einer lichtunabhängigen Weiterreaktion stammen, da gegen die unbelichtete Probe gemessen wurde, die sich in diesem Zeitraum nicht veränderte.

Die Z/E-Isomerisierung war also auch hier durch langwellige Bestrahlung erreicht worden. Ihr Betrag lag jedoch deutlich unter der Isomerenausbeute von 69% (ΔE/E) bei höheren Thiolkonzentrationen (22.7 Vol.%, langwellige- und Rubinbande ungefähr gleich hoch).

Die Vergleichsprobe mit Blaulicht (Tabelle 23/3a) ergab deshalb auch nur eine Ausbeute von 7.64%, also ungefähr die Hälfte der durch Orangelight hervorgerufenen Photoumwandlung.

Entsprechend wurde ein Ansatz mit nahezu vollständig zum Rubinoid umgesetzter β-UE belichtet. Mit 25 Vol. % Mercaptoethanol in der Reaktionsmischung (Tabelle 23/7a) ergab sich bei 600nm Licht eine Ausbeute von 37.2% ZZE-Isomeren. Dieser Wert lag deutlich über dem, mit weniger Thiol (11.4%) behandelten Material, war aber niedriger als bei einem Volumenanteil von 22.7 Vol. % Nucleophil.

Dagegen ergab die Parallelprobe mit Blaulicht (Tabelle 23/7c) auch nur 20.86% Isomerisation. Das war weniger als bei Einstrahlung in die Rotbande, wiederum ein deutlicher Hinweis dafür, daß die Z/E-Konversion über zwei unterschiedliche Wege ablaufen kann. Die Ausbeute lag etwas über dem Belichtungsergebnis der β-UE im denaturierten Rubinoid mit Weißlicht (siehe B. 2.2.5).

Wurde dagegen β-UE in 8M Harnstoff denaturiert, nur teilweise (ca. zu 75%) mit Thiol umgesetzt und mit Orangelight (600nm) belichtet, zeigte sich nach anschließender Weißlichtbestrahlung im Säuren ein Differenzsignal mit einem Effekt von 1.1%, welcher nicht eindeutig einer Z/E-Isomerisierung zugeordnet werden konnte. Das Minimum des Signals war sehr stark längerwellig verschoben (596nm) gegenüber der üblichen E/Z-Rückisomerisierung (575nm). Das zeigte, daß es sich bei den Reaktionen im harnstoffdenaturierten, partiell

"reduzierten" Zustand um eine andere Reaktion handeln muß als bei partieller Thiolanlagerung im Nativen.

Ein ähnliches Phänomen konnte ebenfalls bei PC festgestellt werden, welches mit SDS denaturiert wurde (die Entfaltung mit SDS war nicht so effektiv wie mit Harnstoff). Hier wurde in H₂O mit Weißlichtbestrahlung ein Differenzspektrum erhalten, welches formal ebenfalls einer Z/E-Isomerisierung entsprach (siehe B. 2.5).

Liegt der Chromophor erst in helicaler Form vor, kann Isomerisierung an C-15 nur noch über das C-10 Additionsprodukt erreicht werden. Solange das Protein nicht voll entfaltet ist, steht der Chromophor noch in Wechselbeziehung mit dem Protein und liegt auch noch relativ gestreckt vor. Unter diesen Bedingungen scheint eine Konfigurationsänderung erleichtert und durch direkte Einstrahlung in die Verdinbande erreichbar zu sein.

2.3.5 Reversibilität der Orangelicht- Reaktion

Für die Z/E- Isomerisierung ($\Delta E/E \approx 2-3\%$) mit Rotlicht in mit Harnstoff partiell denaturiertem PC (SIEBZEHNROBL, 1985; siehe B. 2.3.7), zeigte sich eine (teilweise durch Ausbleicheffekte überlagerte) E/Z- Rückisomerisierung durch Grünlicht. Diese Rückreaktion verlief maximal, wenn das Protein in 4M Harnstoff vorlag, (PC/50%, β - UE/35%), und benötigte viel längere Belichtungszeiten als die Hinreaktion (Hinreaktion: PC/3 min, β - UE/3min belichten mit 627nm, Rückreaktion: PC/48min, β - UE/30min belichten mit 500nm). Der Zyklus konnte nur einmal durchlaufen werden, wiederholte Rotbelichtung führte nur noch zum Ausbleichen der Lösung.

Wurden analoge Versuche mit Orange/Grün- Belichtungen an partiell in 0.1M KPP mit Mercaptoethanol umgesetzter β - UE durchgeführt, so konnte auch hier eine teilweise Revertierbarkeit der Isomerisation durch Belichtung im Maximum der Verdinchromophore erreicht werden.

Wurde das Chromoprotein nach Zusatz von 22.7 Vol.% Mercaptoethanol mit (Rot-) 600nm und gleich anschließend mit Grünlicht (528/550nm) bestrahlt, so reduzierte sich das nach der ersten Belichtung aufgenommene Differenzsignal (Tabelle 23/8c, 9). Im Absorptionsspektrum war eine Zunahme der Extinktion der langwelligen Bande zu beobachten.

Bei Bestrahlung mit Grünlicht (Maximum: 550nm) ergab sich ein Z/E- Isomerisierungseffekt von 23%, für Grünlicht mit 528nm 27.4%. Das entsprach 50 bzw. 60% der Isomerisationsrate ohne nachfolgende Rückbelichtung.

Die Rückreaktion mit kürzerwelligem Licht war also wesentlich effektiver, woraus man schließen konnte, daß das ZZE- Isomere auch im partiell "reduzierten" Zustand kürzerwelliger absorbiert (vergleichbar dem freiem Chromophor bei DHOEBV bzw. ZZE- PC im harnstoff- denaturierten Zustand).

Das reine ZZZ- Isomer hat vermutlich bei 550nm nur noch geringe Absorption, sodaß 527nm- Licht hauptsächlich vom ZZE- Isomer aufgenommen wird.

Handelt es sich tatsächlich um eine revertierbare Reaktion, sollte sich mit 550nm Licht ein Photogleichgewicht einstellen, welches weiter auf Seiten des ZZE- Isomeren liegt als bei der 527nm Belichtung.

2.3.6 Isomerisierung bei partiell "reduziertem" Phycocyanin nur an bestimmtem Chromophor?

Um festzustellen, ob die Ausbeutesteigerung in partiell reduzierter β - UE auf die differentielle Reaktion eines der beiden Chromophore zurückzuführen war, wurde zum Vergleich die α - UE in einem ähnlichen Reaktionsablauf belichtet.

Das Absorptionsspektrum einer mit 15 Vol.% Mercaptoethanol partiell umgesetzten α - UE zeigte bei Belichtung mit Orange (600nm) einen Rückgang der Intensität um 11.5% bei 613nm, ohne Verschiebung des Maximums und ohne Änderung der Rubinbande. Der anschließend in saurem Harnstoffpuffer gemessene ZZE- Anteil lag bei 16%, also ungefähr genauso hoch wie bei Isomerisation über das Rubinoidstadium in 8M Harnstoff (Tabelle 19).

Daraus ließ sich zweierlei ableiten:

- a) Die Isomerisierung an C-15 kann sowohl über den Rubinoid- als auch über den Verdinzustand ablaufen;
- b) die β - UE zeigt eine zusätzliche Steigerung, die auf die bevorzugte und leichtere Isomerisierung eines Chromophors zurückführbar sein kann.

Möglicherweise handelt es sich dabei um den β_{84} - Chromophor, der im nativen PC mehr als α_{84} und β_{155} zugänglich ist. Er absorbiert wesentlich langwelliger ($\approx 623\text{nm}$) als der β_{155} - Chromophor ($\approx 599\text{nm}$, Abb. 50).

Parallelen gibt es dazu wiederum aus der partiell reversiblen Rot/Grün- Photochemie in 4M Harnstoff (SIEBZEHNROBL, 1985). Die α - UE zeigte keine nachweisliche Photochemie. Bei Belichtung mit Rot ging die Intensität der langwelligen Bande zwar analog der β - UE (wenn auch geringer) zurück, Grünlicht führte aber zu keiner Rückreaktion. Somit konnte es sich auch bei der vorangehenden Rotbelichtung im partiell denaturierten Zustand schon um einen, mit Grün fortsetzbaren, also von der eingestrahlichten Wellenlänge unabhängigen, Ausbleichprozeß handeln.

2.3.7 Vergleich der E/Z- Isomerisationsraten von partiell harnstoff- denaturiertem zu partiell mit Mercaptoethanol behandeltem Phycocyanin

Die Analogie der Reaktionsabläufe von PC und seinen Unter-einheiten bei der teilweise reversiblen Rot/Grün- Photokonversion in 4M Harnstoffpuffer und im durch Mercaptoethanol anreduzierten und andenaturierten (=partiell "reduzierten") Zustand, führte zu der Vermutung, daß es sich in beiden Fällen um eine Z/E- Isomerisierung handelte. Die Rückreaktion mit Grünlicht wurde bisher nur im neutralen pH- Bereich untersucht (SIEBZEHNROBL, 1985). Da diese Reaktion jedoch unter diesen Bedingungen vermutlich nie quantitativ ablief (vgl. B. 2.2.3.1) - sie würde extrem lange Belichtungszeiten erfordern, die jedoch eine hohe Ausbleichrate nach sich zögen - wurde sie nun im sauer denaturierten (8M) Zustand bestimmt. Ebenfalls wurde zum Vergleich partiell mit Harnstoff denaturierte β - UE statt mit Rot (627nm), mit Orange (600nm) belichtet (Tabelle 24).

Die Versuche zeigten, daß bei der Z/E- Umwandlung mit Rotlicht im mit Harnstoff denaturierten Protein ca. 7% ZZE- Isomere gebildet wurden. Dabei lag die Isomerisationsrate bei 5M Harnstoff geringfügig höher (Tabelle 24a) als mit 4M. Zudem sah man, daß Rotlicht mit 628nm effektiver wirksam war (25%) als 600nm Bestrahlung (ZZZ absorbiert also auch im neutralen, partiell harnstoff- denaturierten Chromoprotein etwas längerwelliger als ZZE (siehe B. 2.3.5)). Die Isomerisationsrate lag jedoch deutlich unter dem des, im Nativen partiell mit Mercaptoethanol umgesetzten, Phycobiliproteins. Der Rückgang der langwelligen Absorption (positive Bande des Differenzspektrums bei Belichtung in 4/5M Harnstoff) bei Rotlichtbestrahlung sollte parallel laufen mit der festge-

Tabelle 24: Z/E- und E/Z- Konversion von β - UE in partiell denaturierendem Harnstoffpuffer

a) Hinreaktion (in neutralem Harnstoffpuffer)

Ans. Nr.	Chrom. (nm) ¹	Harnst. ² (M/l)/pH	Belichtg. (sec/nm) ³	Extrema (nm)	ΔE^4	E^5 λ_{max}	Z/E-Umw. $\Delta E/E(\%)^6$
1	42.9	4/7.1	180/628	551/636	0.012	0.33	3.6
2a	36	4/7.1	180/600	547/637	0.0075	0.277	2.8
b	36	4/7.1	360/600 +1200/528	- /636 - /636	0.0081 0.0063	0.277	2.9 2.3
3a	28.7	5/7.1	180/600	537/639	0.0075	0.221	3.6
b	28.7	5/7.1	180/628	552/639	0.0106	0.221	4.8

b) Rückreaktion (in saurem Harnstoffpuffer)

Ans. Nr.	Harnst. ² (M/l)/pH	Belichtg. (sec/nm) ³	Extrema (nm)	ΔE^4	E^5 λ_{max}	E-Ausb ⁶ $\Delta E/E(\%)$
1	8/1.9	120/weiß	582/680	0.0068	0.096	7
2a	8/1.8	120/weiß	587/681	0.005	0.086	5.8
b	n.b. n.b.	- -	n.b. n.b.	n.b. n.b.	n.b. n.b.	n.b. n.b.
3a	8/1.9	120/weiß	590/683	0.0048	0.082	5.8
b	8/1.9	120/weiß	580/677	0.0061	0.08	7.6

- 1) eingesetzte Chromophormenge (absolut)
- 2) Harnstoffpuffer enthält 0.1M KPP
- 3) sättigende Belichtungszeit, Belichtungsstufe I (siehe C. 1.5)
- 4) Gesamtsignalthöhe Minimum/Maximum
- 5) Absorption der langwelligen Bande nach sättigender Belichtung
- 6) $\Delta E/E$ in % der Extinktion des langwelligen Absorptionsmaximums

stellten ZZE- Ausbeute. SIEBZEHNROBL (1985) konnte zeigen, daß das Maximum der Umwandlung bei der Hinreaktion (Z/E) bei 5M Harnstoff, die maximale Reversion (E/Z) bei 4M Harnstoff gegeben war (im neutralen pH- Bereich). Höhere bzw. niedrigere Harnstoffkonzentrationen ergaben eine niedrigere oder keine reversible Photoreaktion (z.B. 8M, 3M).

Wie bei partiell reduzierter β - UE kann man annehmen, daß der Chromophor noch nicht die völlig helicale Konformation aufweist, aber bereits "beweglich" genug ist, um einer bevorzugten Photoumwandlung zugänglich zu sein.

2.3.8 CD - Messungen an partiell mit Mercaptoethanol umge- setzter/isomerisierter β - Untereinheit

Der Cirkulardichroismus der β - UE wurde während der gesamten Hin- und Rückreaktion verfolgt, außerdem die Änderungen bei der Denaturierung des Proteins festgestellt.

Die Messungen selbst wurden durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst.

Die Reaktionsmischung konnte im Küvettenraum, nicht, wie bei den Differenzmessungen im ZWS, temperiert werden, und war, bedingt durch die hohen Raumtemperaturen (25-30C), starken Schwankungen unterworfen. Dies hat aber, wie schon früher erwähnt, Auswirkungen auf die Extinktion der Proben.

Die Belichtung der Proben mußte ebenfalls außerhalb des Geräts (Küvette im Eisbad) durchgeführt werden.

Der energiereiche Meßstrahl des Photometers bewirkte auch (siehe B. 2.2.7) bereits eine partielle Rückisomerisierung (Gleichgewicht auf der Seite des stabilen ZZZ- Chromophors). Durch die lange Meßdauer wurde die Probe zusätzlich derart belastet, daß immer ein geringes Ausbleichen in Kauf genommen werden mußte.

Aus den genannten Gründen waren schnelle Messungen erforderlich, um die Proben in möglichst unveränderter Form zu erhalten. Die Folge davon waren stark verrauschte Spektren mit zum Teil erheblichen Schwankungen der CD- Daten, sodaß aus der Fülle der Messungen nur eine begrenzte Anzahl Spektren reproduzierbar blieben (Tabelle 25).

2.3.8.1 Hinreaktion (Z/E- Isomerisierung)

Das CD- Signal einer mit 20 Vol.% Thiol partiell "reduzierten" β - UE (Tabelle 25a/2) zeigte ein Minimum bei 351nm sowie ein Maximum bei 603nm.

Wurde die Probe mit Orange belichtet, so ging die Intensität beider Banden (ohne Änderung in der Bandenform) deutlich zurück. Gleichzeitig verschob sich die Soretbande um 12nm, das positive langwellige Signal um ca. 5nm längerwellig (Abb. 58). Ein ähnliches Verhalten war auch bei Konzentrationen von 15-24 Vol. % Mercaptoethanol zu beobachten.

Tabelle 25: CD- Daten aus Z/E- und E/Z- Isomerisierung von
nativer, partiell "reduzierter" β - UE

a) Hinreaktion (in 0.1M KPP, $\text{ph} = 7.1$)

vor				nach Belichtung				
Nr.	Thiol (Vol%)	Extinktion $E_{\lambda_{\max}} / E_{\lambda_{\text{rub}}}$	CD: -/+ (nm) ¹	$E_{\text{CD}} / E_{\lambda_{\max}^2}$	Belichtg. (min/nm) ³	Extinktion $E_{\lambda_{\max}} / E_{\lambda_{\text{rub}}}$	CD: -/+ (nm) ¹	$E_{\text{CD}} / E_{\lambda_{\max}^2}$
1	15.4	1.06 ₆₀₉ / 0.31 ₄₀₂	n.b.		10/600	1.0 ₆₀₉ / 0.30 ₄₀₂	n.b.	
2	20	0.22 ₆₀₆ / 0.13 ₄₀₄	351/603	0.699	9/600	0.14 ₆₀₈ / 0.13 ₄₁₀	363/607	0.592
3a	21.6	0.194 ₆₀₈ / 0.152 ₄₁₁	n.b.		9/600	n.b.	n.b.	
b	21.6	0.194 ₆₀₈ / 0.152 ₄₁₁	n.b.		9/600		n.b.	
4	22	0.408 ₆₀₈ / 0.492 ₄₁₂	351/597	0.229	8/600	n.b.	354/606	
5	23	0.073 ₆₀₉ / 0.083 ₄₀₄	354/601	0.735	8/600	n.b.	354/606	
6	23.8	0.645 ₆₀₈ / 0.41 ₄₁₀	n.b.		10/600	0.28 ₆₀₉ / 0.45 ₄₁₆	n.b.	
7	24	0.153 ₆₀₇ / 0.146 ₄₁₀	356/601	0.420	9/600	n.b.	368/605	

b) Rückreaktion (in 8M Harnstoffpuffer, pH $\approx$ 2)

vor				nach Belichtung				
Nr.	pH- Wert	Extinktion $E_{\lambda_{max}}$	CD: -/+ (nm) ¹	$E_{CD+}/$ $E_{\lambda_{max}^2}$	Belichtg. sec/(nm) ³	Ext. $E_{\lambda_{max}}$	CD: -/+ (nm) ¹	$E_{CD+}/$ $E_{\lambda_{max}^2}$
1 ⁴	2.5	0.335 ₆₀₀	347/667	0.415	90/weiß	0.326 ₆₀₀	350/672	0.483
2 ⁴	1.8	0.116 ₆₀₀	347/595/668	0.219	60/weiß	0.08 ₆₀₀	350/684	0.331
3a ⁴	2.0	n.b.	350/627		60/weiß	0.094 ₆₀₀	350/656	0.426
b ⁶	2.0	0.055 ₆₀₇ /Sh ₆₀₀	351/633	0.556	50/weiß	0.07 ₆₀₀	350/639	0.840
4 ⁴	2.8	0.337 ₆₆₁	351/648	0.236	90/weiß	0.258 ₆₆₉	352/660	0.362
5	n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.	
6 ⁶	2.0	0.33 ₆₀₂	347/659	0.524	70/weiß	0.415 ₆₀₀	345/664	0.544
7 ⁴	2.2	n.b.	362/656		90/weiß	0.081 ₆₀₀	347/650	0.413

1) CD- Signal: "-" negative, "+" positive Bande

2) $E_{CD+}/E_{\lambda_{max}}$: optische Anisotropie ($\ast E^{-3}$)

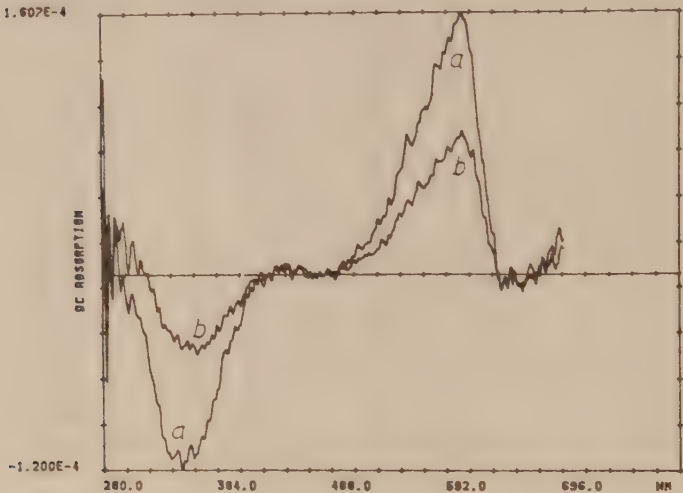
3) Belichtungsstufe I

4) mit Mercaptoethanol in der Meßlösung

5) ohne Thiol (Tabelle 23/2)

6) ohne Thiol (Tabelle 23/6)

Abb. 58: CD- Spektren der mit 20 Vol. % Mercaptoethanol "partiell reduzierten" β - UE in 0.1M KPP (pH=7.1):
a) vor, b) nach neun Minuten 600nm Bestrahlung



2.3.8.2 Rückreaktion (E/Z- Isomerisierung)

Deutliche Änderungen in den CD- Signalen erhielt man auch im sauer denaturierten Zustand (Abb. 59). Das ZZE/ZZZ- Isomergemisch (ZZE- Ausbeute 51%, Tabelle 25/6) wies eine negative Bande bei 347nm und eine positive bei 659nm auf. Letztere besaß eine deutliche Schulter um ca. 590nm (Tabelle 25/6). Im Idealfall war diese Schulter noch verstärkt bei 595nm sichtbar (Tabelle 25/2). Manchmal erschien die Bande auch einheitlich, dafür aber deutlich kürzerwellig verschoben (Überlagerung von Z- und E- Anteil, Tabelle 25/ 3). Nach sättigender Weißlichtbestrahlung (ZZZ) verschwand die kurzwellige Schulter, es bildete sich ein neues Maximum um 665nm aus, dessen Intensität gegenüber der des Isomergemisches erhöht war. Gleiches galt für die Soretbande, jedoch ohne Verschiebung des Minimums.

Das gegenüber dem langwelligen Absorptionsmaximum stark blauverschobene, positive CD- Signal der β - UE (Abb. 60a, Tabelle 26), gab bisher zu der Vermutung Anlaß, daß das Signal in erster Linie vom kurzwellig absorbierenden β_{155} -Chromophor stammt und β_{84} nahezu keine optische Aktivität besitzt (Tabelle 20). Neueste CD- Kalkulationen (SCHNEIDER und SCHARNAGL, 1988) an isolierten β -Chromophoren machen es

wahrscheinlich, daß dies unter anderem auf eine schwache excitonische Kopplung in der Untereinheit zurückzuführen ist. β_{11} besitzt danach, isoliert gesehen, ein deutliches CD-Signal, welches in der β - UE von dem des β_{111} - Chromophors nahezu vollständig überdeckt wird.

Abb. 59: CD- Spektren der E/Z- Rückreaktion in 8M Harnstoffpuffer (0.1M KPP, pH=2.1) der β - UE in partiell "reduziertem" Zustand (23.8 Vol.% Thiol) präparierten ZZZ/ZZE- Isomeren: a) vor, b) nach 70sec Weißlichtbestrahlung

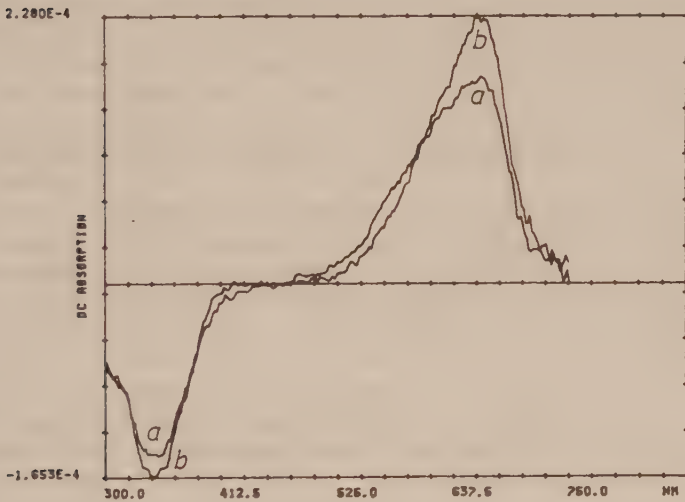


Tabelle 26: Vergleich von UV- Vis und CD- Absorption bei unterschiedlich behandelter β - UE

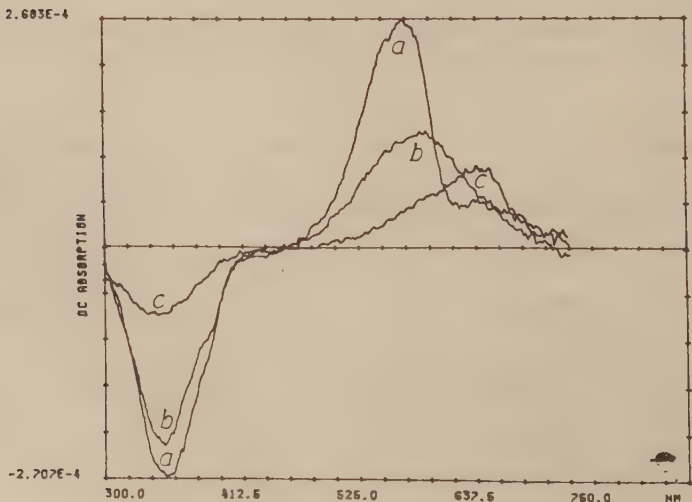
Zustand	CD- Signal (nm)		Absorpt. (nm)	
	+	-	rot	UV
nativ (0.1M KPP, pH=7.1)	592/Sh ₆₆₀	359	604	≈350
nativ (80mM KPP, pH=6)	588	347/Sh ₃₆₂	600	≈350
denaturiert (8M Harnstoffpuffer, pH=7)	608	357/Sh ₃₉₉	600	352
denaturiert (8M Harnstoffpuffer, pH=2)	664	353	660	354
partiell "reduziert" (0.1M KPP, pH=7)	601	353	608	410

Das partiell "reduzierte" Chromoprotein zeigte, im Vergleich zur nativen UE, ein längerwellig verschobenes Maximum (Tabelle 26). Dies könnte durchaus ein Hinweis darauf sein, daß β_{155} bevorzugt reduziert wird und damit das CD-Signal des längerwelligeren β_{84} -Chromophors die Oberhand gewinnt. Ein ähnliches Verhalten (langwellige Schulter im positiven Peak) zeigt sich bei der Behandlung der β -UE mit PCMS (SIEBZEHNROBL, 1987). Die Bindung des Quecksilbersalzes an die Position β_{111} beeinflusst dabei den benachbarten β_{84} -Chromophor.

Bei Denaturierung mit 8M Harnstoff (Abb. 60) ging die Intensität der langwelligen CD-Bande gegenüber dem nativen Zustand um ca. 50%, die der Soretbande um ca. 15% zurück. In diesem Zustand wird das CD-Signal in der Hauptsache von den internen chiralen Einflüssen, d.h. den chiralen Zentren an C-2, C-3, C-31 der Chromophore ausgelöst (LEHNER und SCHEER, 1983).

Das Spektrum des denaturierten Kations folgte der UV-Vis Absorption. Die positive Bande verschob sich gegenüber dem Neutralen um fast 60nm in den Rotbereich. Die Soretbande blieb in ihrer Lage wenig verändert, verlor aber ihre deutliche, langwellige Schulter.

Abb. 59: Qualitative CD-Spektren der β -UE von PC: a) nativ (0.1M KPP, pH=7.1), b) denaturiert (8M Harnstoffpuffer, pH=7.5), sauer denaturiert (8M Harnstoffpuffer, pH=2)



2.4 Photoisomerisierung von nativem Phycocyanin

2.4.1 Vorkommen von ZZE- konfigurierten Phycocyanin- Chromophoren "in situ"

In den vorausgegangenen Kapiteln wurde schon des öfteren auf die strukturelle Ähnlichkeit sowie die unterschiedliche Funktion und Reaktivität von α - und β - Chromophoren hingewiesen (siehe B. 2.2.2.3). Durch die neue und verbesserte Röntgenstruktur (SCHIRMER et al., 1986) konnte die Geometrie aller Chromophore genau untersucht werden. Dabei fiel auf, daß die räumliche Struktur von allen drei Chromophoren nahezu identisch war. Übereinander projiziert decken sie sich vor allem in der Lage der vier Pyrrolringe - mit einer Ausnahme.

Die Messung der Torsionswinkel der Methinbrücken ergab für die Bindung C-15/C-16 -14° für α_{84} , $+2^\circ$ für β_{84} , aber -104° für β_{155} . Bei der Bindung zwischen Ring C und D handelt es sich formal um eine Doppelbindung. Der große Torsionswinkel bedingt eine Entkopplung von Ring D und damit wahrscheinlich die im Absorptionsspektrum zu beobachtende Blauverschiebung. Dies könnte aber auch bedeuten, daß für den β_{155} - Chromophor eine 15E Konfiguration in Betracht gezogen werden kann.

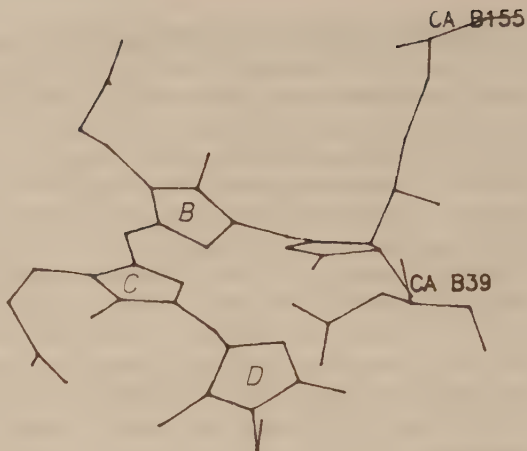
Die Daten aus der Röntgenstruktur lassen auch bis jetzt keine endgültigen Rückschlüsse zu, ob es sich nur um eine Drehung um die Einfachbindung C-14/C-15, oder um eine Verdrillung der "Doppelbindung" handelt.

Einschränkend muß jedoch erwähnt werden, daß der Doppelbindungscharakter der C-15 Methinbrücke nicht so ausgeprägt ist wie bei den übrigen, was die Möglichkeit einer anderen tautomeren Form offen läßt. Die Rotation um eine Methinbrücke kann die der benachbarten nach sich ziehen und dadurch kompensiert werden. Außerdem sind Abweichungen in der Planarität der drei Methinbrücken möglich. Eine Fehlerquote von $\pm 30\%$ muß also bei der Festlegung der Torsionswinkel mit einkalkuliert werden.

Im Endeffekt zeigt sich im PC- Kristall die Ebene von Ring D im Chromophor β_{155} (Abb. 61) um 90° gegenüber Ring C gedreht. Damit liegt der Konfigurationszustand in der Mitte zwischen einer eindeutigen E- und Z- Struktur (SCHIRMER et al., 1986).

Abb. 61:

Konformation des
 β_{155} - Chromophors
laut Röntgenstukturdaten
(SCHIRMER et al.,
1986)



Da man ausschließen dürfte, daß es sich um Z/E- Gemische im Kristall handelt, könnte es auch sein, daß die bestimmte Konformation des Chromophors einen Zustand beschreibt, der nahe einem Maximum liegt, von dem aus er entweder ZZZ oder ZZE- Konfiguration einnehmen kann (Abb. 63). Ob dies nur für den Kristall gültig ist (ev. Packungseffekt), oder auch für PC in Lösung, wurde in der Folge an nativem, unmodifiziertem (d.h. nicht mit Mercaptoethanol behandelten) Biliprotein untersucht.

Es besteht auch die Möglichkeit, daß eine Photoisomerisierung durch die Bedingungen während der Kristallisation erst induziert wird, ähnlich der Z/E- Konversion im partiell harnstoffdenaturierten oder im nativen, mit Mercaptoethanol partiell umgesetzten, Zustand (siehe B. 2.3).

2.4.2 Vorkommen von ZZE- konfigurierten Phycocyanin- Chromophoren "in vitro"

Die Prüfung auf ZZE- konfigurierte Chromophore in PC wurde an gefriergetrocknetem Phycocyanin begonnen. Das hatte allein den Grund, daß ein Lyophilisationsschritt normalerweise am Ende einer Pigmentisolierung aus dem Organismus stand (siehe C. 2.1.9.1). Die Aufbewahrung des so behandelten Materials war problemloser als das Einfrieren großer Volumengen. Zur weiteren Verwendung konnte zu jedem Zeitpunkt ein Teil des PC's abgenommen werden ohne den Rest zu schädigen (wie es bei häufigem Einfrieren und Wiederauftauen der Fall gewesen wäre), um so Lösungen beliebiger Konzentration herzustellen.

Da bei den vorangegangenen Meßreihen der größte ZZE- Effekt in saurem Harnstoffpuffer erhalten wurde, schien ein Test in dieser Umgebung am sichersten. Tatsächlich konnte bereits bei der ersten Messung ein Differenzspektrum erhalten werden, welches qualitativ identisch war zu dem der E/Z- Umwandlung bei Isomeren, die über den Rubinoidzustand im denaturierten PC präpariert worden waren.

Die Folge brachte eine systematische Untersuchung dieses Effekts im nativen und denaturierten Zustand, sowie bei lyophilisiertem, kristallinem und frisch isoliertem PC. Dadurch sollte ein zuverlässiger Beweis für das generelle Vorliegen von ZZE- Isomeren im Protein erbracht werden, sowie ein möglicher Nachweis dafür, daß nur einer von drei Chromophoren im PC- Monomer isomerisiert wird.

Alle Versuche wurden, sofern nicht anders erwähnt, in Dunkelheit oder unter grünem Sicherheitslicht durchgeführt.

2.4.2.1 Photoisomere in lyophilisiertem Phycocyanin

Der in sauer denaturierender Lösung festgestellte Photoeffekt des lyophilisierten PC's lag quantitativ weit unter der ZZE- Ausbeute, die bei den über das Rubinoid in 8M Harnstoff präparierten Proben gemessen wurde (Tabelle 27).

Bei Durchführung der Differenzmessungen unter Raumtemperatur kam es zu Überlagerungen der durch Belichtung erzielten geringen Veränderungen mit einem, als Temperatureffekt bezeichneten, Phänomen. Form und Intensität der langwelligen Bande des Absorptionsspektrums von PC ist in geringem Umfang abhängig von der Temperatur.

Es wurden immer Differenzspektren von unbelichteten (partiell ZZE- konfigurierten) gegen belichtete Proben aufgezeichnet. Blieb die Küvette untertemperiert, so wurde die Probe während der Belichtung angewärmt (um ca. 5°C). Die Absorptionsbande wurde dabei schmaler und die Intensität stieg dafür geringfügig an. Im Differenzspektrum ergab dies ein Signal mit einer starken Zunahme bei 667nm, sowie einer geringeren Abnahme bei 600 und 700nm beiderseitig dieser Bande.

Die E/Z- Umwandlung wurde immer aus der Gesamtsignalhöhe des Differenzsignals prozentual zur langwelligen Extinktion der belichteten Probe berechnet. Der Betrag des Temperatureffektes lag um ein Vielfaches höher als der Lichteffect.

Da die gleichmäßige Beibehaltung einer Temperatur während der gesamten Messung mit nur einer Probe (im HP- Photometer, siehe C. 1.4) nicht möglich war, wurde wiederum im ZWS mit zwei Proben, von denen immer eine als Referenz unbelichtet blieb, gearbeitet. Das hatte den zusätzlichen Vorteil, daß das Meßsignal 10- fach verstärkt werden konnte, und mit dem Kryostaten eine Temperierung des Küvettenraums unterhalb der Raumtemperatur möglich wurde (siehe C. 1.4). Letzteres erschien auch im Hinblick auf die Stabilität der Photoisomere günstiger, um eine eventuell mögliche temperaturbedingte E/Z- Umwandlung, zu verlangsamen.

2.4.2.1.1 Photoumwandlung bei Phycocyanin, gelöst und gemessen in Harnstoffpuffer

Die Absorptionsdifferenzspektren wurden stets nach ausreichender thermischer Äquilibrierung der Proben, sowohl nach dem Ansetzen, als auch nach Belichtung, im Küvettenraum aufgezeichnet.

Die Differenzspektren von lyophilisiertem, sauer denaturiertem PC waren qualitativ identisch zu den Photoreaktionen bei ZZE- PC- Peptiden und dem in denaturiertem Rubinoidzustand präparierten ZZE/ZZZ- Isomerengemisch (siehe B. 2.2.2). Das Spektrum zeigte ein Minimum bei $\approx 575\text{nm}$, ein Maximum bei $\approx 675\text{nm}$ und war relativ symmetrisch (Abb. 44).

Die quantitativen Änderungen bei Belichtung waren so gering, daß sie nur am verstärkten Differenzsignal, aber nicht im Absorptionsspektrum vor und nach der Belichtung zu erkennen waren.

Am auffälligsten war die starke Streuung der Werte unter scheinbar relativ gleichbleibenden Bedingungen. Dafür konnte zunächst keine befriedigende Erklärung gegeben werden. Deshalb wurde der Einfluß von Temperatur und pH- Werten näher untersucht (Tabelle 27).

Die Auswirkungen der Temperatur zeigten sich zunächst im Unterschied der Meßwerte, die bei Raum- sowie bei niedrigeren Temperaturen erhaltenen wurden (Tabelle 27). Ein ZZE- Effekt bei ca. 25°C von rund 0.55% ($\Delta E/E$, unkorrigiert!) ließ sich durch Absenken der Temperatur auf ca. 0.7% (12°C) und ca. 1.3% (3-5°C) steigern. Im Vergleich dazu konnte jedoch auch bei 12°C einmal eine ZZE- Ausbeute von über 1.4% ermittelt werden. Letzteres, zusammen mit der Schwierigkeit, daß die Küvetten bei niedrigen Temperaturen (<5°C) anliefen, führte dazu, eine Meßtemperatur von 11-12°C einzuhalten.

Lyophilisiertes PC wurde zu diesen Messungen in auf 12°C vorgekühltem Harnstoffpuffer aufgelöst, jedoch konnte letztlich kein deutlicher Unterschied zu Proben erkannt werden, die in Puffer von Raumtemperatur aufgenommen wurden (Einfluß von Temperatur auch bei freien Chromophoren in diesem Bereich nicht feststellbar, siehe B. 1.1.3.4).

Tabelle 27: Einfluß von pH- Wert und Temperatur auf den im (sauren) Harnstoffpuffer feststellbaren ZZE- Anteil in lyophilisiertem PC

Nr.	pH-Wert	Temp. (C) ¹	Differenz			Abs.	ZZE-Gehalt	
			Bel. (sec)	Extrema (nm)	ΔE^2	$E_{\lambda_{max}}^3$	gem. (%) ⁴	korrr. (%) ⁵
1	2.1	25	80 ⁶	585/660	0.0074	1.35	0.55	0.47
2	6.0	25	80 ⁶	577/664	0.0024	0.622	0.4	0.34
3	1.9	25	60 ⁶	575/667	0.0025	0.451	0.55	0.47
4	1.9	11	60 ⁶	579/677	0.0042	0.474	0.89	0.77
5	1.9	5	60 ⁷	575/666	0.014	1.065	1.32	1.14
6	1.95	3	30 ⁷	580/675	0.004	0.313	1.32	1.14
7	3.3	12	120 ⁷	584/670	0.0019	0.269	0.70	0.60
8	4.3	12	120 ⁷	586/657	0.0011	0.509	0.21	0.18
9	1.35	12	60 ⁷	576/671	0.0027	0.374	0.71	0.61
10	1.9	11	60 ⁷	577/673	0.0074	0.503	1.49	1.28
11	1.9	12	120 ⁷	575/685	0.0051	0.701	0.73	0.63
12	1.6	12	120 ⁷	575/675	0.0016	0.56	0.29	0.25
13	1.9	11.5	120 ⁷	572/674	0.0029	0.308	0.94	0.81
14	2.0	12	120 ⁷	591/671	0.0013	0.14	0.96	0.83
15	2.0	12	120 ⁷	577/680	0.0013	0.136	0.98	0.84
16	1.9	12	120 ⁶	579/676	0.0009	0.402	0.21	0.18
17	1.9	12	120 ⁶	575/674	0.0012	0.165	0.75	0.65

- 1) Die angegebene Temperatur bezog sich , mit Ausnahme der Raumtemperaturmessungen, auf die Kältemischung im Kryostat. Die aktuelle Temperatur in der Küvette lag 2-4°C höher.
- 2) Gesamtsignalhöhe Minimum/Maximum
- 3) Absorption der langwelligen Bande bei 662nm nach sättigender Belichtung
- 4) ZZE- Ausbeute: ΔE in % der Extinktion des langwelligen Absorptionsmaximums
- 5) absoluter % Anteil an ZZE- Chromophoren nach Korrektur (siehe C. 2.2.3)
- 6) sättigende Belichtungszeit, Weißlicht, Belichtungsstufe I (siehe C. 1.5)
- 7) sättigende Belichtungszeit, Weißlicht, Belichtungsstufe II (siehe C. 1.5)

Im Einfluß des pH- Wertes ließ sich die gleiche Tendenz wie bei präparierten ZZZ/ZZE- Isomeren (siehe B. 2.2.2.1) erkennen. Mit steigendem pH (>4) sank die Menge des nachweisbaren ZZE- Gehaltes, Tabelle 27/8). Ebenfalls wurden bei einem pH von unter 1.8 niedrigere Meßwerte erhalten (Tabelle 27/11, 12). Der optimale pH- Wert wurde bei ca. 1.9 festgelegt.

Das geeignete Maß an Belichtung war schwierig festzustellen, da die Proben relativ schnell auszubleichen begannen. 120sec Weißlicht mit der Belichtungsstufe II ergab z.B. bei pH=2 und 12C eine ZZE- Ausbeute von 0.96% (Tabelle 26/14). Mit 60sec war die Umwandlung noch nicht vollständig (ca. 90%), mit 180sec wurde bereits ein niedrigeres Maximum (entsprach dem Ausbleichen der langwelligen ZZZ- Absorption) und ein Rückgang von ΔE um 30% gegenüber dem 120sec- Wert beobachtet.

2.4.2.1.2 Stabilität von ZZE- Isomeren in saurem Harnstoffpuffer

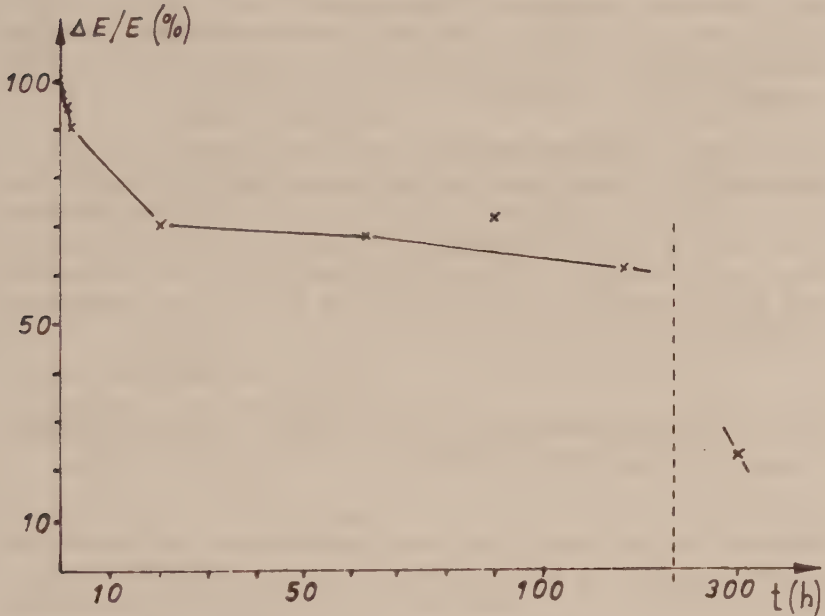
Nachdem der gemessene Photoeffekt mit ca. 0.9% (E/E- Durchschnittswert bei pH $\approx$ 1.9, 12C aus Tabelle 27) erheblich niedriger lag, als man bei vollständig ZZE- konfiguriertem β_{155} - Chromophor erwarten würde, lag die Vermutung nahe, daß eventuell das Lösen des PC's im sauren, denaturierenden Puffer die Reaktion von E nach Z energetisch begünstigt und deshalb der gemessene Effekt nach Belichtung nur noch den letzten Rest der bereits in einer Dunkelreaktion abgelaufenen Isomerisierung darstellt.

Zur Überprüfung dessen wurde ein Stabilitätstest in saurem Harnstoffpuffer über mehrere Tage hinweg durchgeführt. Das in 8M Harnstoffpuffer (enth. 0.1M KPP, pH=1.9) gelöste, lyophilisierte PC wurde zwischen den Messungen dunkel bei ca. 8C aufbewahrt.

Es stellte sich heraus, daß die ZZE- Chromophore innerhalb der ersten Stunden relativ beständig waren (Abb. 62). Danach setzte eine langsame E/Z- Konversion im Dunklen ein; nach 12 Tagen lag der noch zu beobachtende Effekt nahe 0.

Dieses Ergebnis stimmte mit den Beobachtungen der Stabilität des präparierten ZZE/ZZZ- Gemisches (siehe B. 2.2.2.2) sehr gut überein. Es war nicht anzunehmen, daß eine plötzliche E/Z- Isomerisierung (katalytisch?) durch Harnstoff oder niedrigen pH- Wert beim Einbringen des Proteins in die sauer denaturierende Umgebung stattfand.

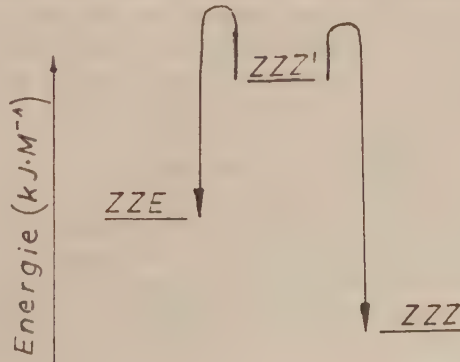
Abb. 62: Stabilität des Isomerenanteils in lyophilisiertem PC, gemessen in saurem Harnstoffpuffer



Die über kurze Zeitabstände stabilen ZZE- Isomere würden für die Frage der Konfiguration an nur einem Chromophor bedeuten, daß während des Weges von der Isolierung bis zum Lösen des lyophilisierten Materials in saurem Harnstoffpuffer sich das Gleichgewicht immer mehr auf die Seite des energetisch begünstigten ZZZ- Konformers verschiebt. Zuletzt liegt nur noch ein Bruchteil des ursprünglich zu 100% E- konfigurierten β_{155} - Chromophors "in vitro" vor (SCHMIDT et al., 1987).

Abb. 63:

Energetische Positionsveränderungen der Photoisomere von PC bei Isolierung bzw. Kristallisation



Diese Annahme würde auch zu den Röntgenstrukturdaten nicht in Widerspruch stehen. Auch im kristallinen Verband könnten die isomeren Chromophore eine äußerst labile Position einnehmen (Torsionswinkel!), die beim Lösen dazu führt, daß die Konfiguration in den energetisch bevorzugten Grundzustand umklappt (Abb. 63, siehe B. 2.4.1).

Auch erhöhte Temperatur zeigte keinen Einfluß auf das Z/E-Verhältnis. Inkubation in saurem Harnstoffpuffer bei 45°C und 61°C (im Dunklen) resultierten letztlich in Photoumwandlungsraten von ca. 0.7%, also nicht signifikant verschieden zu kühl gehaltenem PC. Dies stand in Einklang mit den Ergebnissen aus den Stabilitätsuntersuchungen freier ZZE-Chromophore (siehe B. 1.1.3.4)

2.4.2.1.3 Photoumwandlung bei Phycocyanin, gelöst und gemessen in Phosphatpuffer

Der in saurem Harnstoffpuffer gemessene Photoeffekt lag so niedrig, daß anfangs in nativem Zustand keinerlei Effekt gefunden und deshalb eine völlige Stabilität des ZZE-Isomers angenommen wurde. Bei stärker konzentrierten Ausgangslösungen konnte dann hingegen eine deutliche Photoumwandlung beobachtet werden.

Auch die Differenzspektren in nativem PC ließen sich qualitativ unmittelbar mit denen des präparierten ZZE/ZZZ-Gemisches (siehe B. 2.2.3) vergleichen (Abb. 46). Einer geringen Abnahme bei ca. 590nm stand eine große Zunahme bei ca. 630nm gegenüber. Die quantitative Photoumwandlung ($\Delta E/E$) lag im Durchschnitt bei 0.55% (Tabelle 28), also ebenfalls niedriger als im sauer denaturierten Zustand. Bei Ansäuern der belichteten Isomerenlösung konnte erneut eine weitere Steigerung der Photoumwandlung erreicht werden (siehe B. 2.2.3.1). Bei pH=7.1 (Tabelle 28/1a) wurde durch eine zweite Belichtung bei pH=1.8 nochmals ein Effekt von 0.16% (Minimum/Maximum - 600/697nm) festgestellt.

Belichtete man dieselbe Probe (Tabelle 27/1b) unmittelbar im Säuren, betrug der Photoeffekt viel weniger als im Nativen. Dies wurde in diesem Zusammenhang auf eine erhöhte Dunkelreversion im stark sauren Medium zurückgeführt (bei präparierten ZZE-Isomeren Stabilität gegenüber Licht im Neutralen erhöht! siehe B. 2.2.3.1)

Tabelle 28: Einfluß des pH- Wertes auf die in KPP feststellbare ZZE- "Ausbeute" in lyophilisiertem PC

Nr.	ph- Wert	Bel. ¹ (sec)	Differenz		Abs.	E- Ausb.
			Extrema (nm)	ΔE^2	$E_{\lambda_{\max}}^3$	gem. (%) ⁴
1a	7.1	70	592/637	0.025	3.0	0.73
b	1.5	60	595/686	0.0007	0.355	0.18
2a	7.4	90	600/638	0.0097	2.36	0.41
b	1.8	40	580/685	0.0036	0.326	0.23
3a	7.4	40	584/630	0.005	0.875	0.64
b	1.7	40	625/685	0.0006	0.116	0.52
4	7.4	40	583/629	0.0016	0.403	0.4
5	1.9	100	603/673	0.0008	0.434	0.18

- 1) Belichtungsstufe I, Weißlicht (siehe C. 1.5)
- 2) Gesamtsignalhöhe Minimum/Maximum
- 3) Absorption der langwelligen Bande nach Belichtung
- 4) ΔE in % der Extinktion des langwelligen Absorptionsmaximums

2.4.2.1.4 Stabilität von ZZE- Isomeren in neutralem Phosphatpuffer

Analog zum sauer denaturierenden Milieu wurde auch die Stabilität der Isomere in neutralem KPP getestet. Die Messung selbst erfolgte jedoch nach Denaturierung und Ansäuern des Proteins. Die Photoreaktion konnte, solange die Lösung des lyophilisierten PC's im Dunklen (auch bei Raumtemperatur) aufbewahrt wurde, über mehrere Stunden unverändert gemessen werden. Es wurde keine Dunkelreversion festgestellt.

Es zeigte sich dabei auch, wie bei präpariertem Isomerengemisch (Tabelle 16), eine erstaunliche Stabilität gegenüber Licht. 4min Tageslicht reduzierte nicht die ZZE- Ausbeute (0.7% Effekt, gemessen in 8M Harnstoff, pH=1.9 sowohl in der Dunkel- als auch in der dem Tageslicht ausgesetzten Probe). Selbst kurze Bestrahlung mit Weißlicht (20sec, Belichtungsstufe I) bewirkte nur eine E/Z- Isomerisierung von ca. 50%. Das bestätigte wiederum die bisher festgestellte Tatsache, daß ZZE- konfigurierte Chromophore im Nativen zwar stabilisiert, aber nicht völlig lichtunempfindlich sind. 10 minütige Inkubation bei 45°C im Dunkeln führte ebenfalls zu keinem Rückgang der Photoaktivität.

2.4.2.1.5 Photoumwandlung bei enzymatisch abgebautem Phycocyanin

Lyophilisiertes, in 0.1M KPP gelöstes PC wurde wahlweise mit Pepsin und Trypsin abgebaut. Es zeigte sich, daß ein enzymatischer Abbau des Proteins keinen Einfluß auf den ZZE- Isomerenanteil der Chromophore ausübte.

Der Abbau mit Pepsin wurde in saurem KPP (pH=1.9) im Dunklen durchgeführt. Nach 3h 30min (um einen vollständigen Abbau sicherzustellen) wurde die Probe mit Harnstoff denaturiert (Endkonzentration 8M, pH=1.9) und belichtet. Das resultierende Differenzspektrum erwies sich qualitativ (Extrema: 588/670nm) und quantitativ (ZZE- Ausbeute ca. 1%) identisch zu der Photoumwandlung in nicht enzymatisch abgebauten PC.

Ein analoger Versuch mit trypsinbehandeltem PC (gleiche Reaktionsbedingungen) ergab ähnliche Resultate (Extrema: 587/680nm, 0.75% Effekt).

Der Versuch, die Photoumwandlung an peptisch abgebautem PC in saurem KPP (ohne Harnstoff) zu messen ergab ein Differenzspektrum, welches einem Ausbleichen der langwelligen Absorption und einer möglichen Bildung von Oxidationsprodukten an der Luft zugeschrieben wurde (Zunahme bei 552nm, Abnahme bei 674nm). Die Messung in neutralem KPP führte zu einer reinen Ausbleichreaktion des langwelligen Absorptionsmaximums.

Das Absorptionsspektrum von PC- Peptiden in saurem KPP wies Maxima bei 642, 350 und 276nm auf. Es war damit deutlich unterschiedlich zum Spektrum von integralem PC in diesem Milieu (Abb. 39). Im sauer denaturierten Zustand war kein Unterschied zwischen abgebautem und integralem Protein vorhanden ($\lambda_{max}=662nm$). In neutralem KPP ergaben tryptisch und peptisch abgebautes PC ein Maximum bei 604nm; das Spektrum ähnelte dabei partiell denaturiertem Protein.

2.4.2.1.6 Einfluß von Licht auf lyophilisiertes Phycocyanin

Die große Variabilität der gemessenen Photoeffekte konnte nur unbefriedigend durch Faktoren wie Temperatur, pH- Wert, Rückbelichtungszeit, Ausbleichen, etc. erklärt werden.

Den größten Einfluß schien dagegen Licht, welches unmittelbar auf lyophilisiertes PC einwirkte, auszulösen.

Während eines Tages wurde zweimal die Photoreaktion am selben Material gemessen. Die Probe, die seit längerer Zeit

dunkel im Eisschrank aufbewahrt wurde, zeigte einen Photoeffekt von ca. 0.7% (Tabelle 29/7). Nachdem im Laufe des Tages mehrmals ein Teil des Lyophilisats dem PC- Vorrat entnommen worden war, es also eine unbestimmte Zeit nicht ganz abgedunkelt bei Raumtemperatur stand, betrug der gemessene Photoeffekt schließlich 1.2% (Tabelle 29/6).

Durch zusätzliche Weißlichtbestrahlung konnte die ZZE- Ausbeute sogar, abhängig von der Lichtintensität, bis auf knapp 2% gesteigert werden (Tabelle 29/1, 2).

Tabelle 29: Steigerung der Photoaktivität in PC durch Belichtung im lyophilisierten Zustand

Nr.	Behandlg. (min/nm)	Differenz			Abs.	E-Ausb
		Bel. ¹ (sec)	Extrema (nm)	ΔE^2	$E_{\max}^3$	gem. ⁴ (%)
1	10/weiß ⁵	60	577/670	0.0163	0.964	1.69
2	10/weiß ⁶	120	576/671	0.0054	0.282	1.92
3	30/628 ⁷	100	578/671	0.0024	0.253	0.96
4	30/528 ⁸	120	578/683	0.0014	0.179	0.77
5	10/430 ⁹	60	579/673	0.0011	0.274	0.4
6	hell ¹⁰	60	580/671	0.0029	0.242	1.2
7	dunkel ¹¹	60	570/670	0.0022	0.307	0.72

- 1) sättigende Belichtungszeit, Weißlicht, Belichtungsstufe I (siehe C. 1.5)
- 2) Gesamtsignalhöhe Minimum/Maximum
- 3) Absorption der langwelligen Bande nach sättigender Belichtung
- 4) ΔE in % der Extinktion des langwelligen Maximums
- 5) Belichtungsstufe III, Raumtemperatur
- 6) Höhere Lichtintensität (Leitz- Projektor), Eisbad, Probe mit N₂ überschichtet
- 7) Belichtungsstufe III, Rotlicht
- 8) Belichtungsstufe III, Grünlicht
- 9) Belichtungsstufe III, Blaulicht
- 10) lyophilisiertes PC im Tageslicht (Neonröhre) stehen gelassen
- 11) lyophilisiertes PC längere Zeit dunkel aufbewahrt

Handelt es sich dabei um eine reguläre Z/E- Isomerisierung? Die Belichtung mit Rotlicht erbrachte jedenfalls eine, wenn auch nur geringfügig höhere, ZZE- Rate als bei Einstrahlung von Grünlicht. Da jedoch die Absorptionsmaxima von Z und E

im neutralen Milieu relativ eng nebeneinander lagen, ließ sich daraus noch kein endgültiger Beweis erstellen.

2.4.2.1.7 Auswirkung von Licht während der Lyophilisation

Die Steigerung des Photoisomerenanteils durch Belichtung von lyophilisiertem PC konnte man gut mit der Z/E- Isomerisierung von PC im partiell harnstoff- denaturierten Zustand (siehe B. 2.3.7), sowie in partiell "reduzierter" β - UE (siehe B. 2.3.2) vergleichen.

Durch die Lyophilisierung wird dem Protein Wasser entzogen, was eine Veränderung der Tertiärstruktur bewirkt. Damit wird auch die Chromophorumgebung verändert, was eine Konformationsänderung der Chromophore nach sich ziehen könnte.

Eine mögliche Erklärung könnte sein, daß es während diesem Prozeß zu einer Anlagerung von nucleophilen Gruppen aus dem Apoprotein an das C-10 Atom der mittleren Methinbrücke des Chromophors kommt, die Isomerisierung also nach dem Schema der Mercaptoethanoladdition an denaturiertes PC abläuft.

Die andere Möglichkeit wäre ein Reaktionsweg über den Verdinchromophor, wenn man davon ausgeht, daß es sich bei lyophilisiertem PC, von dem man annehmen kann, es enthält immer noch einen bestimmten Prozentsatz Wasser, um einen nur partiell denaturierten Zustand handelt.

Im Folgenden wurde frisch isoliertes, gereinigtes PC während der Lyophilisation verschiedenen Lichtqualitäten ausgesetzt (Tabelle 30), um abzuklären, ob die Z/E- Konversion über einen Rubinoid- oder einen Verdinzustand abläuft (Schema 3). Nach beendeter Gefriertrocknung (Dauer ca. 12h) wurde die Probe lichtdicht verpackt und sofort in saurem Harnstoffpuffer und in neutralem KPP vermessen. Dabei wurde die Rückbelichtung immer mit Weiß-, Grün- und Rotlicht durchgeführt.

Würde die Z/E- Isomerisation während der Dehydratisierung über ein C-10 Additionsprodukt laufen, sollte man bei dieser Versuchsanordnung eine maximale Photoreaktion bei Einstrahlung in die Rubinoidbande erwarten.

Das Wirkungsspektrum (Abb. 64) zeigte aber deutlich, daß die Belichtung mit Rotlicht (628nm) während der Lyophilisation die größte ZZE- Ausbeute, ermittelt durch Rückbelichtung mit Weißlicht in saurem Harnstoffpuffer, erbrachte (5.26%).

Die E/Z- Isomerisierung mit Weißlicht erfolgte bei niedrigen Lichtintensitäten und verlief quantitativ (unter Berücksichtigung des Stabilitätszustandes bei nativem PC!). Auch hier konnte in neutralen, sättigend mit Weißlicht behandelten, Proben durch Ansäuern und Denaturieren eine zusätzliche Steigerung der Isomerisation erreicht werden.

Tabelle 30: Einfluß von Licht während der Gefriertrocknung von PC

Lyoph. ³ (bei nm)	Denaturiert ¹		Nativ ²	
	Belichtg. (sec/nm)	E-Ausb (%) ⁷	Belichtg. (sec/nm)	E-Ausb (%) ⁷
dunkel	60/weiß ⁴	0.3	40/weiß ⁴	0.0
370 (UV)	60/weiß ⁴ 120/528 ⁶	0.0 0.0	60/weiß ⁴	0.0
430 (blau)	60/weiß ⁴ 120/628 ⁶ 60/528 ⁶	2.78 1.33 0.78	120/weiß ⁴ 120/628 ⁶ 120/528 ⁶	0.99 0.89 0.83
528 (grün)	60/weiß ⁴ 120/528 ⁶ 60/628 ⁶ 120/660 ⁵	3.88 1.29 3.3 0.0	30/weiß ⁴ 100/528 ⁶ 60/628 ⁶	1.63 1.39 1.42
628 (rot)	80/weiß ⁴ 220/528 ⁶ 60/628 ⁶	5.26 3.45 2.24	60/weiß ⁴ 60/528 ⁶ 30/628 ⁶	2.2 1.87 2.05
660 (dunkel- rot)	30/weiß ⁴ 120/528 ⁶ 120/628 ⁶	4.4 2.43 2.82	120/weiß ⁴ 120/528 ⁶ 120/628 ⁶	2.44 2.45 1.89
weiß	100/weiß ¹ 120/528 ⁶ 120/628 ⁶	5.94 2.95 3.49	40/weiß ⁴ 120/528 ⁶ 120/628 ⁶	2.63 2.61 2.48

1) gemessen in 8M Harnstoffpuffer (enth. 0.1M KPP, pH=1.9)

2) gemessen in 0.1M KPP (pH=7.1)

3) Lyophilisierung in 18 bis 20 Stunden, Belichtungsstufe I (siehe C. 1.6)

4) Belichtungsstufe I

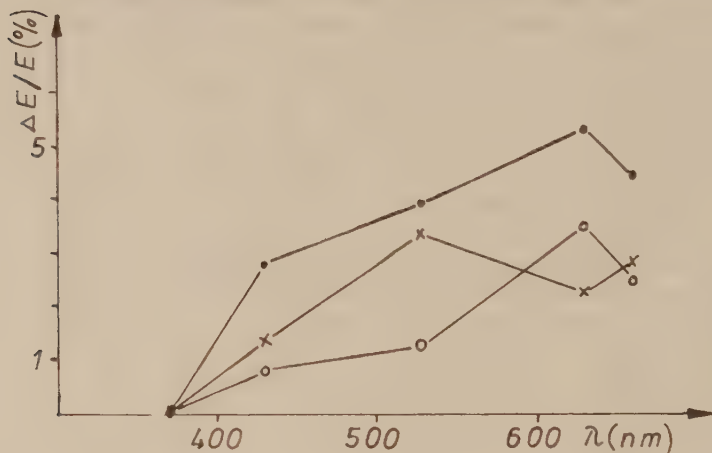
5) Belichtungsstufe II

6) Belichtungsstufe III (siehe C. 1.5)

7) ΔE in % der Extinktion des langwelligen Absorptionsmaximums nach Belichtung

Bei Verwendung der Filter mußten die niedrigeren Transmissionsraten eingerechnet und deshalb die Einstrahlung intensiviert werden (Belichtungsstufe II/III, siehe C. 1.5)). Dabei kam es jedoch parallel zur Isomerisierung auch zu Ausbleichreaktionen, die sich gegenseitig überlagerten. Die sättigende Belichtungsdauer konnte damit schlecht abgeklärt werden. In der Folge wird deshalb das Ergebnis anhand der im sauer denaturierten Milieu mit Weißlicht rückisomerisierten Proben erläutert.

Abb. 64: Abhängigkeit der Bildung von ZZE- Isomeren während der Lyophilisation von der Lichtqualität; Rückreaktion durch Belichtung in saurem Harnstoffpuffer mit: .) Weiß-, x) Grün-, o) Rotlicht



Wenn man sich PC im dehydratisierten Zustand als neutrales, partiell denaturiertes Protein vorstellt, liegen die Absorptionswellenlängen für ZZZ- und ZZE- Isomer nahe beieinander, wobei die Z- gegenüber den E- konfigurierten Chromophoren, wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, längerwelliger absorbieren.

Deshalb führte erwartungsgemäß, d.h. wenn die Isomerisierung über den Verdinchromophor verläuft, rotes Licht zu höheren ZZE- Ausbeuten als grünes. Bei der Lage des Absorptionsmaximums eines Gemisches mit wechselnden Isomerenanteilen, würde trotz eines weiten überlappenden Wellenlängenbereiches Licht mit 628nm stärker die Isomerisierung von Z nach E, Licht mit 528nm jedoch die von E nach Z bewirken. Eine gleichberechtigte Reaktion in beide Richtungen (siehe Schema 9b) würde auch den analogen Effekt für grünes und weißes Licht (letz-

teres beinhaltet den gesamten Spektralbereich von Blau bis Dunkelrot) erklären.

Strahlte man noch langwelliger ein (650nm), wurde sicherlich nur noch die Reaktion Z/E- begünstigt. Der niedrigere Wert erklärte sich durch die schon allgemein geringe Absorption bei dieser Wellenlänge.

Die deutlich geringere ZZE- Ausbeute bei Einstrahlung in den blauen Wellenlängenbereich schloß eine Isomerisierung über einen Rubinoidzustand nicht völlig aus, machte sie jedoch relativ unwahrscheinlich. Möglicherweise kam es auch hier wieder zu einer Überlagerung von zwei Reaktionsabläufen, wie schon bei der nativ mit Mercaptoethanol behandelten β - UE gezeigt (siehe B. 2.3).

Ungeklärt blieb die Frage, an welchem Punkt der Dehydratisierung eine Z/E- Isomerisierung möglich wird. Bei langen Belichtungszeiten kann es möglicherweise zu einer ungünstigeren Gleichgewichtseinstellung (durch Ausbleichen der Chromophore) kommen, als bei einer bestimmten, für die maximale ZZE- Ausbildung notwendigen, Einstrahlung. (Dies wurde z.B. bei der Präparation von Isomeren in harnstoff- denaturiertem Zustand bei Belichtung des Rubinoidzustandes festgestellt.) Wurde PC in absoluter Dunkelheit lyophilisiert, wurden auch keine ZZE- Isomere gebildet. Hielt man es auch weiter dunkel, ließ sich zu keiner Zeit eine Verschiebung des Gleichgewichts in ZZE- Richtung erkennen. Wurde es jedoch nachfolgend im lyophilisierten Zustand 60sec mit Weißlicht bestrahlt, so ließ sich wieder ein minimaler Effekt (0.4%) feststellen. Da während der Präparation immer möglichst lichtgeschützt gearbeitet wurde, Lichteinwirkung auf das Protein, vor allem bei der Gefriertrocknung aber nicht immer völlig verhindert wurde bzw. werden konnte, eine Isomerisation aber bereits mit nur geringen Lichtgaben induziert wurde, erklärt sich der geringe und wechselnde Anteil an ZZE- konfigurierten Chromophoren, der ursprünglich in lyophilisiertem PC festgestellt werden konnte (siehe B.2.4.2.1)

Damit wurde jetzt jedoch auch der Unterschied bei den gemessenen ZZE- Ausbeuten bei standardisierten Versuchsabläufen verständlich. Obwohl bei der Durchführung der Photochemie durchgehend unter grünem Sicherheitslicht gearbeitet wurde, konnte nicht mehr festgestellt werden, ob und wie lange lyophilisiertes PC dem Tageslicht ausgesetzt war (z.B. beim Abwiegen!).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß ZZE- Isomere während eines Dehydratisierungsprozesses unter Lichteinwirkung gebildet wurden. Die quantitative Isomerenverteilung ließ aber keine Aussage darüber zu, ob Isomerisation an allen oder nur an einem Chromophor stattfand.

2.4.2.2 Photoisomere in Phycocyanin- Lösungen

Phycocyanin, welches während der Präparation keiner Lyophilisation unterworfen wurde, zeigte in keinem Fall photochemische Eigenschaften.

Belichtungsversuche mit Weißlicht wurden an den verschiedensten PC- Proben sowohl in saurem Harnstoffpuffer als auch in neutralem KPP durchgeführt (frisch nach der DEAE- Säule, nach Dialyse gegen bid. H₂O, nach Einfrieren in 0.1M KPP und Wiederauftauen, nach einigen Tagen Stehen in 0.1M KPP kühl und dunkel). Die Absorptionsdifferenzmessungen zeigten entweder keinerlei Reaktion bei Belichtung, oder nach Einstrahlung höherer Intensitäten nur Ausbleicheffekte der langwelligen Absorption. In nahezu allen Fällen wurde dieselbe Probe, die in Lösung keinen E- Isomerenanteil aufwies, parallel oder im Anschluß an diese Messungen lyophilisiert. Die nicht unter absolutem Lichtausschluß gefriergetrockneten Proben wiesen in allen Fällen ZZE- konfigurierte Chromophore auf.

Auch ein "Denaturierungsschritt" während der Aufarbeitung (Ammonsulfatfällung zur Reinigung und Konzentration) schien keine Isomerisation nach sich zu ziehen.

Dies galt ebenso für Harnstoff. PC in Lösung wurde im neutralen pH- Bereich mit kristallinem Harnstoff (Endkonzentration 8M) denaturiert und gegen 0.1M KPP renaturiert. Nach Belichtung zeigte sich kein für eine E/Z- Umwandlung charakteristisches Differenzsignal; nach Lyophilisation der salzfreien Probe war jedoch ein deutlicher Photoeffekt messbar.

2.4.2.3 Versuch zur Identifizierung von Photoisomeren in kristallinem Phycocyanin

PC- Kristalle wurden nach Entfernung der Mutterlauge im Grünlicht entweder in neutralem KPP, oder in saurem Harnstoffpuffer gelöst und mit Weißlicht belichtet. In keinem Fall konnte ein Anteil von ZZE- Isomeren nachgewiesen werden. Bereits mit kurzen Belichtungszeiten kam es zu einem

Ausbleichen der langwelligen Absorptionsbande (0.1M KPP, pH=7.1: 80sec/25% Extinktionsabnahme).

Auch der Versuch, in den Kristallen, analog zu PC im lyophilisierten Zustand, Photoisomere mit Weißlicht zu erzeugen, brachte keinen Erfolg. Möglicherweise reicht die Dehydratisierung im Kristall nicht aus (binden ca. 50% Kristallwasser), um das Protein im geeigneten Umfang zu "denaturieren".

In diesem Zusammenhang gewannen auch Beobachtungen an lyophilisiertem Material an Bedeutung. Die "normale" Konsistenz gefriergetrockneten PC's war hellblau, flockig, fast watteähnlich. Wurde das Protein jedoch nicht erschöpfend gegen H₂O dialysiert, enthielt also noch Spuren von Salz (aus der Isolierung mit KPP), ähnelte das Lyophilisat einem dunkelblauen Kristallpulver (vermutlich Salzkristalle mit angelagertem PC). Auch dieses Material, obwohl nicht unter Lichttausschluß gehalten, lieferte bei Belichtung in saurem Harnstoffpuffer nur minimale Isomerisationsraten (0.2%) bzw. reine Ausbleichreaktionen. Durch die fremden Salzionen im Protein könnte man sich auch hier einen größeren Wasseranteil im PC vorstellen. Auch die Farbe ließ auf ein Protein in einem nativeren Zustand als das salzfrei lyophilisierte PC schließen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse aus Röntgenstruktur, und Absorptionsdifferenzmessungen über einen möglicherweise ZZE-konfigurierten β_{155} - Chromophor (Abb. 61), lassen verschiedene Erklärungen zu.

Entweder wird während der Kristallisation ein Denaturierungszustand erreicht, bei dem schon geringe Lichteinwirkung eine ZZE- Isomerisierung einleiten kann. Das würde bedeuten, daß der β_{155} - Chromophor (Abb. 63) im Protein einen äußerst instabilen Zustand einnimmt, wodurch seine Konfiguration zwischen zwei eindeutigen Lagen (ZZE oder ZZZ) "wechselt". Oder der Chromophor ist eindeutig ZZZ- konfiguriert, aber die Doppelbindung $-C_{15}=C_{16}-$ und/oder die nebenliegende Einfachbindung $-C_{14}-C_{15}-$ sind/ist sehr stark verdreht.

2.4.2.4 Photoisomere in lyophilisierten Untereinheiten

Analog zu integralem PC wurde der Einfluß von Lyophilisation und Belichtung auf die Entstehung von ZZE- Isomeren bei den PC- Untereinheiten untersucht.

Wurde die Gefriertrocknung an frisch präparierter und gegen

H₂O dialysierter β - UE unter Weißlicht ausgeführt (Tabelle 31), stellte man bei nachfolgender Belichtung in saurem Harnstoffpuffer erneut ein $\Delta E/E$ von ca. 6% fest. Vergleich man dazu nicht lyophilisiertes Material, fand man auch hier eine ZZE- Ausbeute von ca. 1.8% für die β - und 1.2% für die α - Untereinheit. Der Parallelversuch mit nicht durch Gefrier-trocknung behandeltem, integralem PC zeigte wiederum negatives Resultat (siehe B. 2.4.2.2).

Eine Erklärung dieses Phänomens könnte sein, daß die UE während der isoelektrischen Fokussierung, die unter denaturierenden Bedingungen abläuft, oder während der Renaturierung, die nie in völliger Dunkelheit durchgeführt wird, ZZE- Iso-mere bilden.

Allerdings besteht auch die Möglichkeit, daß die Aufspaltung des Proteins in die einzelnen UE im renaturierten Pigment ausreicht, um das Protein in einen nicht voll nativen Zustand (im Vergleich zum integralen PC) zu versetzen, bei dem durch Belichtung (Tageslicht) Konfigurationsisomere erzeugt würden.

Tabelle 31: ZZE- Ausbeute in PC- Untereinheiten, mit und ohne Lyophilisation, gemessen in saurem Harnstoffpuffer (enth. 0.1M KPP)

β - UE	Lyo-phil.	Differenz			Abs.	E-Ausb.
		Bel. ¹ (sec)	Extrema (nm)	ΔE^2	$E\lambda_{max}$	(%) ⁶
	+ ³	60	576/671	0.0076	0.127	5.97
	+ ⁴	60	575/671	0.0023	0.116	1.98
	- ⁵	60	575/673	0.0188	1.028	1.83
α - UE	- ⁵	80	579/673	0.0082	0.481	1.8

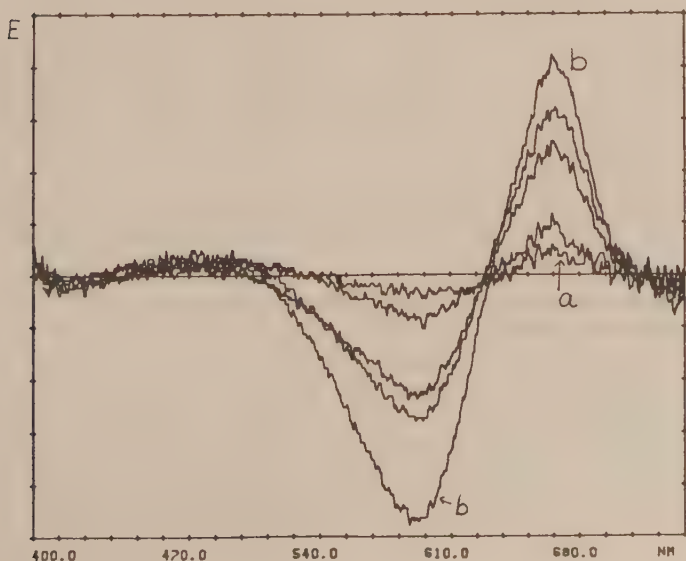
- 1) Belichtungsstufe II, Weißlicht (siehe C. 1.5)
- 2) Gesamtsignalhöhe Minimum/Maximum
- 3) im Weißlicht (60Watt, 19h) lyophilisiert
- 4) dunkel lyophilisiert
- 5) frisch nach Untereinheitentrennung
- 6) ΔE in % der Extinktion des langwelligen Absorptionsmaximums

2.4.2.5 Konfigurationsänderungen durch Tenside

Wurde PC im Neutralen (H_2O , $pH=6.5$) mit 0.1 Vol.% SDS denaturiert, verschoben sich die Maxima der roten und der UV-Bande geringfügig von 610, 350nm auf 608, 347nm. Gleichzeitig ging die Extinktion des langwelligen Maximums um ca. 17% zurück, während sie im UV-Bereich um ca. 18% zunahm ($Q_{v1s}/Q_{v2s}=1.45$ gegenüber 6.4 im nativen (0.1M KPP) und 0.48 im mit 8M Harnstoff denaturierten Zustand. Das Verhältnis der Banden zueinander änderte sich nicht mehr wesentlich mit weiterer Tensidzugabe.

Ein Gemisch aus ZZZ- und ZZE- PC, welches durch Belichtung des Rubinoidzustandes in neutralem Harnstoffpuffer erhalten worden war (E/E sauer denaturiert:13%, neutraler KPP: 3.6%, siehe Tabelle 12), wurde nach Renaturierung über erneute Chromatographie an P6- DG in reines destilliertes Wasser überführt (SDS in KPP ergab eine starke Trübung). Anschließend wurde es bei einem pH- Wert von 3.6 mit 0.1 Vol.% SDS denaturiert. Das Differenzspektrum der Probe nach Belichtung mit Weißlicht (Abb. 65) zeigte eine Absorptionsabnahme bei 604nm, sowie eine Zunahme bei 680nm.

Abb. 65: Absorptionsdifferenzspektrum von ZZE/ZZZ- PC, präpariert über das Rubinoid (siehe B. 2.2.1) in H_2O /0.1% SDS ($pH=3.6$): a) vor, b) nach 840sec Weißlichtbestrahlung



Verglich man dazu eine Rückbelichtung in 8M Harnstoffpuffer bei gleichem pH, lagen Minimum/Maximum dort bei 575 bzw. 671nm (siehe Tabelle 13). Es wurde jedoch eine viel längere Belichtungszeit zur quantitativen Umwandlung benötigt. Wenn man davon ausgehen kann, daß die Denaturierung mit SDS qualitativ zu der mit Harnstoff vergleichbar ist, sollte es sich bei der beobachteten Reaktion ($\Delta E/E=9.8$) also ebenfalls um die E/Z- Rückisomerisation handeln.

Wurde (im Dunklen) lyophilisiertes PC in H₂O (mit HCl ansäuern auf pH=1.8) gelöst, mit 0.1 Vol.% SDS denaturiert und mit Weißlicht bestrahlt, erhielt man ein Differenzspektrum (gegen die unbelichtete Probe), welches spiegelbildlich zu den üblichen Spektren bei Bestrahlung der ZZE- Konfigurationsisomere war.

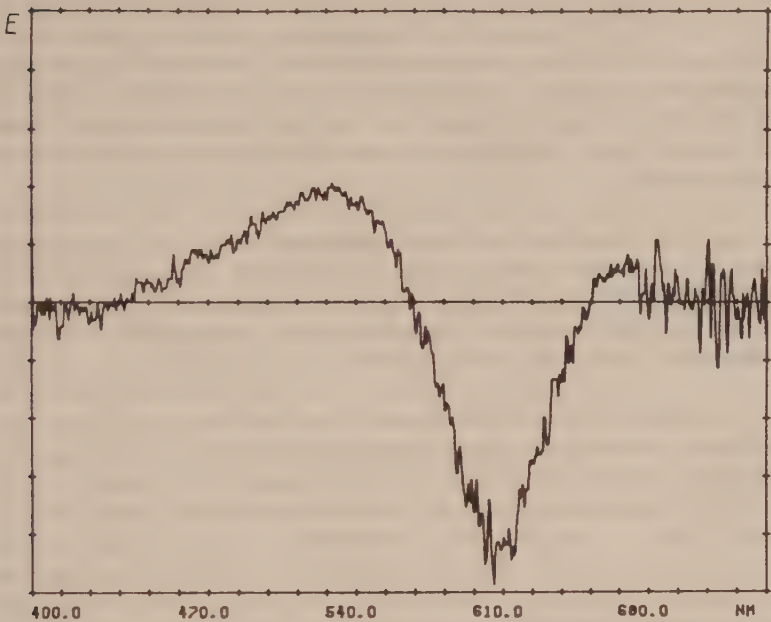
Man beobachtete eine Absorptionzunahme bei ca. 550nm sowie eine Abnahme bei 624nm (Tabelle 32, Abb. 66). Die gleiche Feststellung machte man auch bei neutralen pH- Werten, das Minimum lag dabei aber um etwa 20nm langwellig verschoben. Das Differenzspektrum ähnelte in seiner Form (im Sauren und im Neutralen) dem einer Z/E- Isomerisierung (spiegelbildlich zur E/Z- Photoreversion von PC in neutralem KPP, siehe B. 2.2.3.1). Allerdings waren die Absorptionswellenlängen deutlich unterschiedlich.

Tabelle 32: Z/E- "Umwandlung" bei PC, denaturiert mit 0.1 Vol. % SDS in H₂O

		Differenz		Absorption		ZZE
pH-Wert	Bel. ¹ (sec)	Extrema (nm) ²	ΔE^3	E (λ_{max}) ⁴	Q_{vis}/uv	$\Delta E/E$ (%) ⁵
2.0	180	544/622	0.0077	0.5	1.8	1.92
1.8	120	552/624	0.0094	0.504	1.8	1.87
7.2	120	549/647	0.008	0.376	0.83	2.12

- 1) Belichtungsstufe II, Weißlicht (siehe C. 1.5)
- 2) Maximum/Minimum!
- 3) Gesamtsignalhöhe Maximum/Minimum
- 4) Absorption der langwelligen Bande bei 612/614nm nach Belichtung
- 5) ΔE in % der Extinktion des langwelligen Absorptionsmaximums

Abb. 66: Absorptionsdifferenzspektrum von unmodifiziertem PC in $H_2O/HCl/1\% \text{ SDS}$ ($pH=1.8$): a) vor, b) nach 180sec Weißlichtbestrahlung



Dieses Differenzspektrum war nur durch Belichtung zu erzeugen und erinnerte an eine Z/E- Isomerisierung, wie sie in den vorangegangenen Kapiteln in partiell denaturiertem Zustand gefunden wurde. Jedoch kann auch eine bloße Konformationsänderung des Chromophors durch den Angriff des Tensids auf das Protein nicht völlig ausgeschlossen werden.

2.5 Vergleich der Z/E- Photoisomerisationen von Phycocyanin zu Phytochrom und Phycochrom

Beim Vergleich der Photoreaktionen von Z/E- Isomeren des Phycocyanins ließen sich Ähnlichkeiten, aber auch Unterschiede zu Phytochrom erkennen.

a) Bei der Photoumwandlung von P_{fr} (= 4Z,10Z,15E) nach P_r (= 4Z,10Z,15Z) in nativem (124Kd) und degradiertem (60Kd) Phytochrom erfährt das Absorptionsspektrum im Langwelligen einen hypsochromen Shift von 730-735nm (124Kd) bzw. 720-725nm (60Kd) nach 667nm, im UV von 400nm nach 379nm (RÜDIGER,

1980; VIERSTRA und QUAIL, 1983). Die Intensität in der P_r -Form nimmt dabei stark zu (ϵ_r : 110000 bzw. ϵ_r : 71500cm⁻¹M⁻¹ für das 60Kd-Phytochrom; BRANDLMEIER et al., 1981). Im Falle des Phycocyanins mit einem Gemisch von ZZZ/ZZE-konfigurierten Chromophoren wurde bei der E/Z- Reaktion in neutralem Phosphatpuffer dagegen eine leichte langwellige Verschiebung unter gleichzeitigem geringfügigem Ansteigen der Intensität (geschlossen aus den Differenzspektren, siehe B. 2.2.3, Abb. 46a) des langwelligen Absorptionsmaximums festgestellt.

b) Auch war generell die Photoreversibilität des Phytochroms bei PC (Ausnahme siehe d) nicht vorhanden. Die Z/E- Isomerisierung kann unter vergleichbaren "normalen" Bedingungen (d.h. bei voll nativem Protein) nicht durchgeführt werden, sondern nur die E/Z- Rückreaktion.

c) Vergleicht man die Photoreaktionen auf der Stufe der Peptide bzw. in voll denaturiertem (8M Harnstoff) Protein, können jedoch Parallelen festgestellt werden.

Die Photoisomerisierung der Phytochrompeptide (nach Pepsinabbau, ca. 18 Aminosäuren; THÜMLER, 1984) erfolgt wie bei PC nur von P_{rr} (ZZE) nach P_r (ZZZ), d.h. die E- konfigurierten Isomere mußten ebenfalls über das Rubinoidstadium dargestellt werden (THÜMLER und RÖDIGER, 1983). Das 15E- konfigurierte P_{rr} - Chromopeptid absorbiert als Kation bei 590 und 378nm. Durch Bestrahlung mit Weißlicht (10sec) verschiebt sich das Maximum im roten Wellenlängenbereich auf 665nm, im UV auf 372nm. Dabei geht die Intensität im Langwelligen zurück, im UV- Bereich nimmt sie zu.

Analog (sowohl in Bandenlage als auch Intensität) verhielten sich die Isomere bei PC- Peptiden von Spirulina maxima (THÜMLER, 1984; siehe B. 2.1; ZZE: λ_{max} =575, 370nm, ZZZ: λ_{max} =630, 340nm; in H₂O/Ameisensäure).

Das PC- Gemisch mit ZZZ und ZZE- Chromophoren zeigte im sauer denaturierten Zustand (8M Harnstoff, pH=2) für die E/Z- Reversion ein nahezu deckungsgleiches Differenzspektrum zu den PC- Peptiden (siehe B. 2.2.2.1, Abb. 44). Im Absorptionsspektrum war der Unterschied zwischen ZZE und ZZZ bei Belichtung durch eine langwellige Verschiebung (abhängig vom Isomerenanteil) unter gleichzeitigem Intensitätsanstieg (!) erkennbar (Abb. 43, 56).

d) Neben der geläufigen E/Z- Rückreaktion, ausgehend von den, über das Rubinoid bei denaturiertem Protein präparierten, E-Isomeren, wurde in einigen Fällen auch eine Reaktion erhalten, die als eine direkte Z/E- Isomerisierung der Verdinchromophore interpretiert wurde.

In freien (Modell-) Chromophoren wird dies ermöglicht durch Verzerrung des Chromophorgerüsts mittels sperriger Liganden bzw. N- Alkylierung (FALK et al., 1983a, siehe B. 1.1.2).

Bei proteingebundenen Chromophoren könnte der Einfluß des Proteins auf sie eine Rolle spielen. Die Chromophore liegen im nativen PC in gestreckter Konformation (anti- Z, syn- Z, anti- Z) vor. Durch vollständige Denaturierung (z.B. 8M Harnstoff) werden sie in die all- syn- Z Form umgewandelt (siehe B. 2.2), wie sie auch für freie Verdine (z.B. DHOEBV, 6) typisch ist. Möglicherweise wird durch partielle Denaturierung (4M Harnstoff, siehe B. 2.3.7; partielle Mercaptoethanolanlagerung, siehe B. 2.3.2; Lyophilisierung, siehe B. 2.4.2.1.5 und B. 2.4.2.1.6; Tenside, siehe B. 2.4.2.5) der Chromophor in eine "Zwischenlage" (voll nativ - voll denaturiert) versetzt, in der eine unmittelbare Z/E- Isomerisierung des Verdins durch direkte Belichtung zugänglich wird.

Bei Phytochrom konnte durch gezielten tryptischen Proteinabbau ein 39Kd- Fragment erhalten werden, welches nach wie vor die typische Hellrot/Dunkelrot- Reversion aufweist (YAMAMOTO und FURUYA, 1983; REIFF et al., 1985). Seine spektralen Änderungen bei der Z/E- Reaktion zeigen Ähnlichkeiten zur Belichtung von partiell "reduziertem" PC. Das Absorptionsspektrum des 39Kd- Bruchstücks ähnelt in seiner kurzwellig absorbierenden Form (= ZZZ) dem von partiell harnstoff- denaturiertem P_r (THÖMLER und RÖDIGER, 1983b; $\lambda_{max} = 660\text{nm}$ gegenüber 667nm von P_r). Durch Bestrahlung (Z/E- Isomerisierung) mit 660nm Licht wird eine als P_{b1} bezeichnete Form erzeugt, die dem Meta- R_b Zwischenprodukt auf dem Weg von P_r zu P_{fr} (Schema 1) entspricht (EILFELD und RÖDIGER, 1985). Das Maximum von P_{b1} liegt etwas kürzerwellig verschoben bei 650nm, seine Intensität ist jedoch stark reduziert (Abnahme $\approx 75\%$; REIFF et al. 1985).

Bei partiell mit Mercaptoethanol "reduzierter" PC- β - UE in neutralem KPP wurde ebenfalls eine starke Abnahme der Intensität mit leichter kurzwelliger Verschiebung festgestellt (siehe B. 2.3.2, Abb. 55a). Diese durch Orangelicht (600nm) erzeugte Form konnte durch Grünlicht (528nm) partiell revertiert werden. Dasselbe ist von der Rot/Grün- Photochemie in

partiell harnstoff- denaturiertem PC bekannt (SIEBZEHNROBL, 1985).

Das mit Thiol behandelte PC (β - UE) reagiert damit ähnlich zu P₆₁. Der Phytochromchromophor ist jedoch beweglicher, dabei wird auch für das 39kD Bruchstück eine andere Bindungsstelle für den ZZE ($\equiv$ "P_{fr}") Chromophor angenommen. Im E-konfigurierten PC scheinen hingegen nur geringe Wechselwirkungen zu bestehen.

Ähnlichkeiten sind auch im Hinblick auf die Reaktionen der Phycochrome (siehe A. 2.4) feststellbar:

Bei der Rot/Grün- Photochemie von PC in partiell harnstoffdenaturiertem Zustand (SIEBZEHNROBL, 1985) wurde für die Hinreaktion (für die eine Z/E- Isomerisierung diskutiert wird, siehe B. 2.3.7) im Differenzspektrum (4M Harnstoff, pH=7) eine geringe Zunahme ($\approx$ 550nm) neben einer sehr viel stärkeren Abnahme ($\approx$ 636nm) erhalten.

Bei der Orangelicht- Reaktion von partiell "reduzierter" β - UE konnte analog eine geringe Zunahme bei $\approx$ 450nm, sowie eine starke Abnahme bei $\approx$ 612nm beobachtet werden (Abb. 55a).

Entsprechende spektroskopische Parallelen sind aus der Photochemie der Phycochrome bekannt.

Das Differenzspektrum der rotbelichteten Form (640nm- Licht; $\equiv$ ZZE) minus der grünbelichteten Form (520nm- Licht, $\equiv$ ZZZ) zeigt für Phycochrom a ebenfalls eine Zunahme bei 625nm, die in ihrer Intensität mehr als 2.5 fach so stark ausgeprägt ist wie die zugehörige Abnahme bei 580nm (pH=4.4, eine Fraktion aus Tolypothrix distorta; BJÖRN und BJÖRN, 1976.

(Ähnliche Intensitätsverhältnisse bei z.T. stark verschobenen Wellenlängen wurden auch bei anderen Phycochromen gefunden).

C. ZUSAMMENFASSUNG

1. Im Photozyklus des Phytochroms höherer Pflanzen kommt dem Chromophor am Apoprotein eine wichtige Funktion zu. In der Primärreaktion von P_r nach lumi-R (siehe Schema 1) wird eine Z/E- Isomerisierung zwischen den Pyrrolringen C und D diskutiert. Phytochrom in seiner physiologischen Form P_{fr} hätte demnach einen Chromophor mit ZZE- Konfiguration, während er in der P_r - Form all-Z konfiguriert ist.

Um dies zu überprüfen, wurden analoge Isomerisierungsreaktionen an freien Bilatrienen-/Dihydrobilatrienen- a,b,c und am strukturell verwandten Phycocyanin untersucht.

2. Als erste Modellsubstanzen wurden dafür OEBV (Bilatrien- a,b,c) und DHOEBV (2,3- Dihydrobilatrien- a,b,c, selbes Konjugationssystem wie der Phytochromchromophor) herangezogen. Die Konfigurationsisomere wurden im präparativen Maßstab nach einer modifizierten Methode von FALK et al. (1980) durch Photoisomerisierung der Rubinoide dargestellt und charakterisiert.

3. Als Photoisomer wurde bei OEBV/DHOEBV neben dem all- Z konfigurierten Ausgangsprodukt immer nur das 4Z,10Z,15E- Produkt identifiziert. Das ZZE- Isomer absorbierte durch sein "quasi" verkürztes Konjugationssystem an C-15 im Langwelligen ca. 50nm hypsochrom verschoben gegenüber dem ZZZ- Isomer. Die UV- Bande blieb in ihrer Lage nahezu unverändert. Das Intensitätsverhältnis Q_{vis}/uv sprach jedoch für eine gestrecktere Konformation des ZZE- konfigurierten Chromophors gegenüber der helikalen Form des all-syn-Z Ausgangsproduktes.

Die Absorption der Isomere zeigte eine starke Abhängigkeit vom umgebenden Lösungsmittel und vom Protonierungsgrad.

4. Die E/Z- Photoreversion von OEBV/DHOEBV wurde in Abhängigkeit unterschiedlicher Faktoren (Lösungsmittel, Protonierungsgrad, Temperatur, Belichtungsdauer, etc.) charakterisiert.

Am Auffälligsten war die bevorzugte schnelle Rückreaktion bei nur kurzen Belichtungsdauern in DMSO (Stabilisierung des ZZZ- Zustandes durch Wasserstoffbrücken), die proto-

nenkatalysierte Dunkelreversion in saurem DMSO bzw. auch die Dunkelreversion durch erhöhte Temperatur.

5. Durch länger andauernde Bestrahlung konnten vor allem bei Pigmentlösungen in CHCl_3 weitere Photoreaktionen (möglicherweise Photooxidationen) erzielt werden. Der Anteil der auf diese Weise erzeugten Abbauprodukte (Violine, Purpurine) war entscheidend abhängig vom Anteil der UV-Strahlung in der verwendeten Lichtquelle.

6. Zum Vergleich zu entsprechenden Untersuchungen an nativem und degradiertem Phytochrom wurde die FT-IR- Spektroskopische Charakterisierung der Z/E- Isomere von OEBV/DHOEBV angewendet. Dabei stellte sich DHOEBV als sinnvoller Modellchromophor heraus.

Charakteristische Unterschiede zwischen OEBV und DHOEBV ergaben sich fast nur im Bereich von 1700 bis 1500 Wz (Doppelbindungsregion: C=O , C=C , C=N).

Hier lagen aber auch die Unterschiede zwischen ZZZ- und ZZE- konfigurierten Chromophoren. Im Bereich von ≈ 1100 Wz , bei dem im Fall des Phytochroms die strukturellen Unterschiede des Pr bzw. des Pr_{r} - Chromophors (neben der Carbonylregion) deutlich hervortraten, konnten bei den Modellchromophoren keine signifikanten Änderungen beobachtet werden.

7. Die Belichtung von ZZE- Chromophoren ergab bei den IR-Messungen Spektren, die zu den ZZZ- isomerisierten Ausgangsprodukten deutliche Unterschiede aufwiesen.

Auch Belichtungsexperimente in Zusammenhang mit ^1H -NMR Spektren erbrachten Verschiebungen der 10H - Methinsignale bei ZZE- und rückisomerisierten ZZZ- Produkten.

In diesem Zusammenhang wurde die Möglichkeit eines Zwischen-/Folgeproduktes Z^* während der E/Z- Isomerisierung diskutiert. Andeutungen ergaben sich auch aus minimalen UV-Vis- spektroskopischen Unterschieden zwischen ZZZ und belichtetem ZZE.

8. Photoisomere wurden auch bei natürlich vorkommenden Bili-verdinen erzeugt. Da die Isomerisierung (d.h. die Eliminierung des Thiols) und die Aufreinigung bei der freien Säure erschwert war, wurden dafür die entsprechenden Dimethylester eingesetzt.

Durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie konnte für BV IX α - dme das Vorliegen von drei Photoisomeren

(4E,10Z,15Z, ZZE, EZE) neben ZZZ nachgewiesen werden.

Bei der Isomerisierung von BV IX₁- dme entstanden sowohl photolabile Produkte (die entweder durch nachfolgende Belichtung das Ausgangsprodukt bzw. aber auch andere Produkte ergaben), als auch eine Reihe von, bei Belichtung stabilen, gefärbten Produkten, die eine exakte Identifizierung von Konfigurationsisomeren erschwerten. Sie wurden deshalb nicht weiter charakterisiert.

9. Es wurde versucht, Photoisomere bei gestreckten Biliverdinen zu erzeugen. Phorca-, Isophorca- und Sarpedobilindme verfügen über eine gestreckte Konformation mit z.T. E- Konfiguration, fixiert durch zusätzliche Sechs-/Siebenringe. Sie zeigen spektroskopische Ähnlichkeit zu den gestreckten Chromophoren in nativem Phytochrom. Sowohl bei Phorca-, als auch bei Isophorcabilin- dme wurden sowohl durch direkte Belichtung des Verdins, als auch durch Belichtung des Rubinoids, eine Vielzahl unterschiedlicher, gefärbter Produkte identifiziert. Es konnte jedoch kein Beweis für ein photoreversibles Konfigurationsisomeres erbracht werden.
10. Neben den freien wurden auch proteingebundene Chromophore untersucht. Als geeignetes System erschien das Phycocyanin, welches über einen ähnlichen Chromophortyp wie das Phytochrom verfügt (Ethyl- statt Vinylgruppe an C-18) Die Isomerisierung wurde im Rubinoidstadium durch Weißlichtbestrahlung an PC- Peptiden, sowie auch am integralen Protein und den getrennten Untereinheiten durchgeführt.
11. Die Reaktionsbedingungen für eine optimale ZZE- Isomerausbeute an integralem PC wurde erarbeitet. Die Anlagerung von Mercaptoethanol wurde in neutralem 8M Harnstoffpuffer durchgeführt, die Eliminierung erfolgte, nach Belichtung, mit Salzsäure. Die Charakterisierung der Photoprodukte erfolgte, nach Entfernung des Thiols mittels Gelfiltration, durch UV-Vis- Absorptionsdifferenzspektroskopie (unbelichtete minus belichtete Probe).
12. Das Differenzspektrum bei Belichtung eines ZZZ/ZZE- Isomerengemisches in saurem Harnstoffpuffer zeigte eine Absorptionsabnahme bei $\approx 575\text{nm}$, sowie eine Zunahme bei $\approx 670\text{nm}$. Das Differenzsignal war qualitativ identisch zur E/Z- Isomerisierung bei PC- Peptiden.

Die Ausbeute an ZZE- Isomeren wurde bestimmt aus der Amplitude des Differenzsignals zur Extinktion des langwelligsten Absorptionsmaximums der belichteten (d.h. ZZZ- konfigurierten) Probe (in Prozent). Durch Multiplikation mit einem Korrekturfaktor (aus der Photoumwandlung von reinen ZZE- Isomeren bei PC- Peptiden) wurde ein maximaler Anteil von 11.5% ZZE- Isomeren im Gemisch bei dieser Präparationsmethode ermittelt.

13. Die Amplitude des Differenzsignals war abhängig vom pH-Wert des 8M Harnstoffpuffers. Sie, und damit auch die ermittelte ZZE- Ausbeute, sank mit steigendem pH. Auch durch längere Belichtungszeiten konnte kein quantitativer Umsatz erzielt werden, sondern die Lösung begann stattdessen langsam auszubleichen.

Durch anschließendes Ansäuern und erneutes Belichten konnte ein zusätzlicher Photoeffekt gemessen werden. Die E- Isomere schienen also bei neutralen pH- Werten stabilisiert zu sein.

14. Nach Renaturierung des ZZZ/ZZE- Isomerengemisches durch Gelfiltration konnte in neutralem KPP durch Belichtung ebenfalls eine Photoreaktion beobachtet werden.

Das erhaltene Differenzsignal wies eine geringe Abnahme bei $\approx 575\text{nm}$, sowie eine große Zunahme bei $\approx 630\text{nm}$ auf. Bei neutralem pH- Wert war die Photoreaktion bereits mit geringen Belichtungszeiten abgesättigt und wurde bei weiterer Bestrahlung überlappt durch eine Ausbleichreaktion. Sie verlief ebenfalls nicht quantitativ. Wie im denaturierten Zustand konnte nach Ansäuern bei Belichtung eine Restreaktion beobachtet werden.

Das Differenzsignal in saurem KPP ähnelte in Form und Bandenlage dem in saurem Harnstoffpuffer.

15. Das spektroskopisch festgestellte Verhalten gegenüber Belichtung ließ den Schluß zu, daß auch bei Phycocyanin ZZE- konfigurierte Chromophore existieren und in natives Protein eingebaut werden können (vgl. Ähnlichkeiten zu Phycochromen und Phytochrom/ P_{611}).

Die Amplitude des Differenzsignals und damit die bestimmte ZZE- Ausbeute lag im Nativen deutlich unterhalb der in saurem Harnstoffpuffer. Durch Absenken des pH- Wertes in KPP konnten jedoch vergleichbare ($\approx 10\%$) Ausbeuten erzielt werden.

16. Der Versuch, ZZE- Isomere über den Rubinoidweg bei isolierten α - bzw. β - Untereinheiten des Phycocyanins darzustellen, lieferte vergleichbare Resultate zum integralem Protein.
17. Es wurde auch die Anlagerung von Thiol an native Proteine (integrales PC, isolierte UE) untersucht und dabei, gegenüber früheren Aussagen, eine quantitative Rubinoidbildung, wenn auch bei viel höheren Thiolkonzentrationen, beobachtet.

Bei partieller Anlagerung (ca. 20 Vol. % Mercaptoethanol) an die β - UE in 0.1M KPP, zeigte das Spektrum Charakteristika von Verdin- und Rubinchromophoren. Durch Belichtung in diesem partiell "reduzierten" Zustand konnte eine Photoreaktion erhalten werden, die auf eine Z/E- Isomerisierung schließen ließ:

Bei Einstrahlung in die Verdinbande (600nm) konnten in der nachfolgenden Rückbelichtung Ausbeuten von $\approx 70\%$ ZZE- Isomeren nachgewiesen werden. Dies stellte eine enorme Steigerung gegenüber der geläufigen Präparationsmethode dar. Aufgrund der Belichtungswellenlänge sollte es sich um eine direkte Isomerisierung des Verdinchromophors handeln.

18. Durch Vergleich der Differenzmaxima mit den Absorptionen der einzelnen PC- Chromophore wurde eine bevorzugte Reaktion am β_{84} - Chromophor wahrscheinlich gemacht.
19. Die Orangelicht- Reaktion zeigte Parallelen zur reversiblen Rot/Grün- Photochemie an partiell harnstoff- denaturiertem (4M) PC, sodaß auch in diesem Fall von einer Z/E- Isomerisierung ausgegangen werden dürfte.
20. Die Röntgenstruktur an kristallisiertem PC ergab für den β_{84} -, im Gegensatz zu den restlichen Chromophoren, einen großen Torsionswinkel (104°) zwischen Ring C und D, und stellte damit auch eine mögliche ZZE- Konfiguration an dieser Methinbrücke zur Diskussion. Es wurde deshalb versucht, einen entsprechenden Beweis auf spektroskopischem Weg (UV-Vis- Differenz) zu erbringen.
21. Weder bei frisch isoliertem PC in Lösung, noch bei (aufgelösten) PC- Kristallen, konnte durch Belichtung in neutralem KPP bzw. in saurem Harnstoffpuffer eine Photoreak-

tion beobachtet werden, die auf das Vorliegen von ZZE-Isomeren schließen ließ.

22. Bei Einsatz von PC in lyophilisierter Form erhielt man durch Belichtung ein Differenzsignal, welches (in KPP und 8M Harnstoff) qualitativ identisch war zur E/Z- Rückreaktion eines ZZZ/ZZE- Isomerengemisches. Die Amplituden der Differenzsignale waren jedoch sehr viel niedriger.

Die festgestellte ZZE- Ausbeute in diesem Material schwankte zwischen 0 und 1.3%. Sie schien von Meßtemperatur, Belichtungsstärke, pH- Wert und von der Zeit, die zwischen Lösen und Messen verstrich, abhängig zu sein. Als entscheidender Faktor kristallisierte sich jedoch die Belichtung des lyophilisierten Phycocyanins heraus. Durch Bestrahlung während der Gefriertrocknung konnten ZZE- Anteile von 6% (gemessen bei der Rückbelichtung in saurem Harnstoffpuffer) erzielt werden. Das Maximum des Wirkungsspektrums deutete wiederum auf eine Z/E- Isomerisierung des Verdin- Chromophors hin.

D. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Material, Geräte und Methoden

1.1 Reagenzien

Organische Lösungsmittel für präparative und analytische (Chromatographie, Spektroskopie) Zwecke wurden entweder aus technischen Lösungsmitteln (CCl_4 , CHCl_3 , CH_2Cl_2 , Methanol, Aceton) durch Destillation gewonnen, oder in p.a. Qualität (DMSO, THF, HMPT, CS_2 , Benzol, Toluol; Merck, Darmstadt) eingesetzt. In bestimmten Fällen wurden sie (CHCl_3 , THF) zur Reinigung und Entwässerung über neutrales/basisches Aluminiumoxid (Woelm, Eschwege) chromatographiert.

Für die ^1H -NMR und FT-IR- Spektroskopie fanden Lösungsmittel in UVASOL- Qualität (Merck), zum Teil in deuterierter Form (d_6 -DMSO, CDCl_3 , d_4 -THF) Verwendung.

Reagenzien für die Rubinoiddarstellung bei freien und proteingebundenen Verdinchromophoren: 2- Mercaptoethanol, Ethanthiol (Merck-Schuchard, Hohenbrunn).

Bilirubin (für biochemische Zwecke, Merck) diente als Ausgangsmaterial für die Darstellung von Biliverdin IX α ; Hämin (kristallin; Roth, Karlsruhe) für die der Biliverdin IX α , β , γ und δ dme- Isomeren; Oktaethylporphyrin (Strem, Karlsruhe) für die Präparation von OEBV/DHOEBV.

Enzyme (Pepsin, Trypsin) für den Proteinabbau von Phycocyaninen stammten von Boehringer, Mannheim; Tenside (SDS) für Proteinmodifikationen von Roth, Karlsruhe.

Alle übrigen Substanzen (für die Präparation der Gallenfarbstoff- Ausgangsverbindungen, Puffermedien, etc.) wurden in p.a. Qualität eingesetzt (Merck, Darmstadt/ Serva KG, Heidelberg/ Fluka, Buchs, Schweiz).

1.2 Algenmaterial

Mastigocladus laminosus wurde in 300l Kulturen im Fermenter in Castenholz- Medium (CASTENHOLZ, 1970) gezogen, geerntet und tiefgefroren. In diesem Zustand wurde es von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, 3301 Stöckheim, FRG, bezogen.

1.3 Chromatographie

Für analytische Zwecke wurden HPTLC- Fertigplatten Kieselgel 60 (ohne Fluoreszenzindikator), oder "Reverse Phase" RP-8 HPTLC-Fertigplatten (10 x 10cm) der Firma Merck, Darmstadt verwendet.

Um den Einfluß von Licht auf Produkte bzw. Produktgemische zu ermitteln, wurde eine zweidimensionale DC ausgeführt. Dazu wurde die zu untersuchende Lösung in der linken unteren Ecke der Platte aufgetragen und chromatographiert. Danach wurde die Platte außerhalb der Kammer unter Argon mit Weißlicht bestrahlt, und daran anschließend die Probe mit neuer Laufrichtung (Platte um 90° drehen) erneut im selben Laufmittel chromatographiert.

Präparative Trennungen/Aufreinigungen wurden entweder an Kieselgel 60H (70-230 mesh) über Säulenchromatographie (Z/E-Isomere), oder über Schichtchromatographie an selbstgestrichenen 20x20cm KG 60G- Platten (Schichtdicke 0.25mm) ausgeführt.

Die Isolierung von strukturisomeren Biliverdinen (siehe C. 2.1.5) wurde mit einer Lobar Fertigsäule (größe C), LiChroprep Si 60 (Porengröße 40-63µm) mit einer Vorsäule (Lobar, Größe A, selbes Material; beide von Merck) durchgeführt.

Phycocyanin- Rohextrakte wurden auf DEAE- Cellulose (DE 52, Whatman, Maidstone, England) Ionenaustauscher aufgetrennt. Für die Peptidtrennungen wurde Biogel P10 (Biorad, Richmond, Kalifornien/USA) eingesetzt.

Als weiteres Säulenmaterial für Gelfiltrationen fand Biogel P6- DG Desalting Gel (Abtrennung von Thiolen bei der Präparation von Photoisomeren), bzw. P2 (beide von Biorad) Verwendung.

1.4 Spektroskopie

UV- Vis Spektren (Absorption, "grobe" Absorptionsdifferenz) wurden entweder mit einem Spektrophotometer, Modell 320 mit Basislinienkorrektur der Firma Perkin Elmer, oder mit einem Spektrophotometer Modell 8451A (Hewlett- Packard) aufgenommen.

Absorptionsdifferenzmessungen (Photochemie an PC) wurden an einem SIGMA ZWS-II 2- Wellenlängen-Spektralphotometer (Sigma

Instruments, Berlin, FRG) bei 5-10 facher Verstärkung durchgeführt. Die analogen Daten wurden über einen AD- Wandler (Technomar model A) in einen Apple IIe Mikrocomputer eingespeist, auf Diskette gespeichert bzw. über einen gekoppelten Schreiber (DIGI - PLOT, Watanabe WX 4671) ausgeplottet.

Es bestand die Möglichkeit, Küvettenhalter und -Raum durch einen Kryostaten zu temperieren.

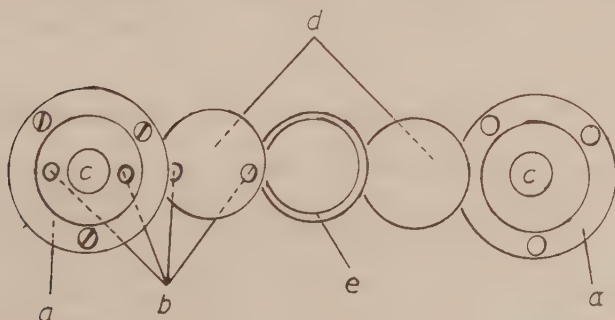
Die Probenlösung wurde mittels einer Belichtungseinrichtung im Photometer belichtet (siehe C. 1.5).

Das Programm für Aufnahme und Wiedergabe von Absorptions- (differenz-) messungen wurde von SIEBZEHNROBL, 1985 (modifiziert 1987) erstellt.

Infrarot Spektren wurden im Fourier- Transform Modus an einem Gerät der Fa. Brooker, Modell IF 113V, in Lösung gemessen.

Die zu messende Substanz wurde in hohen Konzentrationen (50µg pro 25-50µl) in organischen (z.T. deuterierten) Lösungsmitteln aufgenommen und ca. 20µl in eine zylinderförmige Küvette (Abb. 67) eingefüllt; Fenstermaterialien: ZnSe oder CaF₂, Schichtdicke 20µm, Fensterdurchmesser (für Messstrahl) 0.5cm. Küvettenhalter und Küvettenraum wurden mit Wasser/flüssigem Stickstoff auf 5-10°C gekühlt. Die Belichtung der Proben erfolgte durch einen 150 Watt Diaprojektor, der Weißlichtstrahl wurde durch Linsen und Spiegel auf die Küvette (Fenster) im IR- Gerät fokussiert.

Abb. 67: IR- Küvette: a) Küvettengehäuse, b) Einfüllöffnungen, c) Strahlengang, d) Fenster (CaF₂/ZnSe), e) Abstandshalter (Folie, Dicke: 20µm)



CD- Messungen an Phycocyaninen wurden an einem Dichrograph Mark V (Jobin-Yvon, Longjumeau, Frankreich) in zylindrischen Quarzküvetten (Durchmesser: 2.2cm, Schichtdicke: 1cm) ausgeführt.

Fluoreszenzspektren konnten an einem 2- Strahl Photometer DMR 22 mit Fluoreszenzzusatz (450 Watt Xenonlampe, Monochromator Typ M4Q III) der Fa. Zeiss, Oberkochen, oder an einem Spex Fluorimeter aufgezeichnet werden.

$^1\text{H-NMR}$ - Spektren wurden an einem 400MHZ- Gerät, Modell Jeol, mit Tetramethylsilan als internen Standard, in CDCl_3 gemessen. Die Belichtung der Proben erfolgte außerhalb des Gerätes mit einer 150 Watt Halogenlampe.

1.5 Belichtungseinrichtungen

Für die präparative Z/E- Isomerisierung freier und protein- gebundener Tetrapyrrolchromophore sowie diverse Belichtungs- experimente (siehe B. 1.1.3.2) wurde ein 500W Leitz Diaprojektor verwendet. Die Bestrahlung erfolgte mit Weißlicht (Wirkungsspektrum/Intensität siehe Abb. 68) unter Wasser/ Eiskühlung der Probe aus 5-10cm Entfernung.

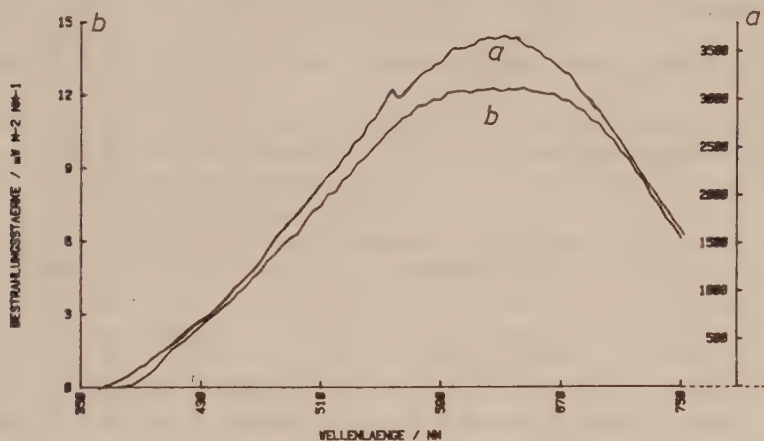
Für die analytische E/Z- Isomerisierung außerhalb (z.B. bei HP- Absorptions(differenz)- oder CD- Messungen) der Photometer sowie im ZWS II (siehe C. 1.4) wurde eine LumiLux 150W (Volpi GmbH, Denzlingen, FRG) Kaltlichtquelle, verbunden mit einem Lichtleiter, eingesetzt. Die Bestrahlung erfolgte mit Weißlicht (Wirkungsspektrum/Intensität siehe Abb. 68) oder bei bestimmten Wellenlängen (Tabelle 33, siehe z.B. B. 2.4. 2.1.5): Interferenzfilter (Fa. Dr. Seitner, Meß- und Regel- technik, Herrsching, FRG).

Tabelle 33: Zur Z/E- Isomerisierung verwendete Filter

Wellen- länge (nm)		Filterbezeichnung	Halbwerts- breite (nm)	max. Trans- mission (%)
UV	370	370 3C RBZ 3-2	9.2	86
blau	430	430 HLX 11-9	8.7	88
grün	528	15-10320 VLO 7-3	7.8	88
grün	550	15-10360 TGU 10-2	8.3	81
orange	600	600 S-NOY 11-1	9.6	93
rot	628	15-10460 UNO 3-3	10.1	92
d.rot	660	660 30 RWE 5-2	11.9	84

Belichtungen mit ultraviolettem Licht wurden in einem Photo-reaktor, Modell RPR-100, The Southern New England Ultraviolet Company, Middletown, Connecticut, USA, durchgeführt. (Sechs Lampen zu je 150 Watt; 2574 bzw 3500 Å)

Abb. 68: Wirkungsspektrum/Intensität der verwendeten Lichtquellen: a) Leitz Diaprojektor, b) Volpi Kaltlichtquelle



1.6 Gefriertrocknung

Zur Lyophilisation von Phycocyaninen wurde eine Anlage vom Modell L 03 (WKF, Brandau) verwendet. Die Belichtung während der Gefriertrocknung wurde entweder mit einer 60 Watt Glühlampe oder mit der Kaltlichtquelle (siehe C. 1.5) durchgeführt.

1.7 Schutzmaßnahmen

Bei der Präparation von freien Gallenfarbstoffen (Ausgangssowie Photoisomerisationsprodukte), sowie bei der Anlagerung von Mercaptoethanol an PC wurde unter Schutzgas (Ar , N_2) gearbeitet (siehe jeweiliges Kapitel).

Da ZZE- konfigurierte Chromophore durchwegs im Weißlicht in ihren stabilsten Zustand (ZZZ) rückisomerisierten, wurde beim Umgang mit Photoprodukten ständig unter Grünlicht gearbeitet. Jedoch wurde auch bei allen übrigen Arbeiten (selbst

wenn die Präparationsvorschriften keinen ausdrücklichen Lichtausschluß verlangten) direkte Lichteinstrahlung vermeiden oder, um jede Möglichkeit von Photoumwandlungen auszuschließen, diese unter grünem Sicherheitslicht ausgeführt.

2. Präparationsvorschriften

2.1 Darstellung der Ausgangsverbindungen

2.1.1 ZZZ- Oktaethylbiliverdin (5)

Die Verbindung wurde nach einer Modifikation der Vorschrift von CAVALEIRO und SMITH (1973), ausgehend von Oktaethylporphyrin, über Eisen- III- oktaethylporphyrinchlorid (WHITLOCK et al., 1969) dargestellt (siehe auch SCHMID, 1983).

Das Produkt wurde durch Säulenchromatographie über Kieselgel 60H mit einem Stufengradienten von 4 bis 7% Aceton in Tetrachlorkohlenstoff gereinigt.

λ_{max} (MeOH): 644, 367nm

[SCHEER (1976): 657nm (15600), 367nm (51200);

SCHMID (1983): 645nm (15000), 366nm (58000)]

DC- Daten: CCl₄/Aceton 24:1, R_f=0.35

[KUFER (1980): CCl₄/Aceton 9:1, R_f=0.47]

¹H-NMR- Daten (ppm, δ): 6.64 (10,15 H), 5.90 (5 H)

[SCHMID (1983): 8.3 (3 NH); 6.61 (10,15 H), 5.87 (5 H); 2.48 (12 H, $\underline{\text{CH}_2}$ -CH₃); 2.25 (4 H, 1,8 - $\underline{\text{CH}_2}$ -CH₃); 1.4-0.9 (24 H, CH₂- $\underline{\text{CH}_3}$)]

2.1.2 ZZZ- A- Dihydrooktaethylbiliverdin (6)

DHOEBV wurde nach der Vorschrift von CAVALEIRO und SMITH (1973) ausgehend von Oktaethylporphyrin via Oktaethylchlorin (WHITLOCK et al., 1969) dargestellt. Der Zink- Komplex des Oktaethylchlorins wurde mit Thalliumfluoroacetat behandelt und das Reaktionsgemisch über eine Aluminiumoxid- Säule chromatographiert, wobei durch Ringspaltung DHOEBV gebildet wurde (siehe auch SCHMID, 1983).

Das Produkt wurde durch Säulenchromatographie über Kieselgel 60H mit einem Stufengradienten von 4 bis 8% Aceton in Tetrachlorkohlenstoff gereinigt.

λ_{max} (MeOH): 595, 350nm
[SCHEER (1976): 594nm (17600), 347nm (39400);
SCHMID (1983): 591nm (18009), 347nm (45000)]

DC- Daten: CCl₄/Aceton 24:1, R_f=0.46
[KUFER (1980): CCl₄/Aceton 9:1, R_f=0.65]

¹H-NMR- Daten (ppm, δ): 6.88 (10 H), 6.01 (15 H), 5.44 (5 H);
2.8-2.2 (14H, -CH₂-CH₃, 1,2 H); 1.39-2.0 (4H, -CH-CH₂-CH₃);
1.273, 1.116, 1.046, 0.946, 0.893 (24H, -CH₂-CH₃)
[SCHMID (1983): 8.65 (3 NH); 6.56 (10 H), 5.97 (15 H), 5.44
(5 H); 2.9-2.1 (14H, -CH₂-CH₃ und 1,2 H); 1.4-2.0 (4H,
-CH-CH₂-CH₃); 0.7-1.4 (24 H, -CH₂-CH₃)]

2.1.3 ZZZ- Biliverdin IX α (11)

Biliverdin IX α wurde nach einer modifizierten Vorschrift von STOLL und GRAY (1977) dargestellt.

50ml DMSO wurden mit N₂ gesättigt und darin 50mg Bilirubin IX α gelöst. Unter ständiger Stickstoffspülung wurde innerhalb von 15min eine Lösung von 50mg 2,3- Dichlor- 5,6- di- cyano- p-benzochinon (DDQ) in 10ml DMSO zugetropft. Nach einer weiteren Reaktionszeit von 20min wurde die dunkelgrüne Lösung in 500ml CHCl₃ eingegossen und mit 250ml H₂O (unter magnetischem Rühren, nicht Schütteln!) gewaschen. Der Waschvorgang wurde vier bis fünf Mal wiederholt, bis die wässrige Phase nur noch schwach braun bis gelb gefärbt war. Die organische Phase wurde über NaCl getrocknet und eingeeengt (Vakuum, Wasserbadtemperatur $\leq 30^{\circ}\text{C}$).

Die Aufreinigung des rohen Biliverdins erfolgte über präparative Schichtchromatographie (Kieselgel, Laufmittel: Toluol/Eisessig/H₂O 5:5:1 Oberphase!, KUFER 1980). Die grüne Hauptbande (R_f=0.1) wurde noch feucht abgekratzt, mit Eisessig (ca. 80ml) eluiert und nach Abtrennung von KG (Zentrifugation) mit CHCl₃/H₂O extrahiert. Die organische Phase wurde mit H₂O neutralgewaschen, über NaCl getrocknet und eingeeengt.

λ_{max} (MeOH): 668, 376nm - 678, 376nm (in konzentrierten Lösungen)
(CHCl₃): 658, 370nm
[KUFER (1980): (MeOH) 668, 378nm;
McDONAGH und PALMA (1980): 666nm (13900), 377nm (49700)]

DC- Daten: RP, CHCl_3 /Eisessig 9:1, $R_f=0.6$
 CHCl_3 /MeOH 93:7, $R_f=0.74$
NP, CHCl_3 /Eisessig/MeOH 90:9.5:1, $R_f=0.8$
[Kufer (1980): Polyamid, MeOH/H₂O 3:1, $R_f=0.05$;
McDONAGH und PALMA (1980): KG, CHCl_3 /Eisessig/MeOH
90:0.1:10, R_f -Wert nicht angegeben]

2.1.4 ZZZ- Biliverdin IX α - dimethylester (12)

Vorschrift modifiziert nach KUFER (1980): Ca. 10mg rohes Biliverdin IX α wurde in 10ml gekühltem MeOH aufgenommen und von unlöslichem Bilirubin abfiltriert. Nach Auffüllen mit 150ml MeOH wurde die Lösung unter N₂ zum Sieden erhitzt und anschließend 60ml einer 20% methanolischen Bortrifluorid (BF₃) Lösung zugetropft. Nach weiteren 10min Rückflußkochen und Abkühlen (Eisbad) wurde die blaugrüne Reaktionsmischung zwischen je 200ml CHCl_3 und H₂O verteilt, die organische Phase noch drei Mal mit je 100ml H₂O gewaschen, über NaCl getrocknet und eingeeengt (Vakuum, Wasserbadtemperatur $\leq 30^\circ\text{C}$).

Der rohe BV IX α - dme wurde durch Säulenchromatographie über Kieselgel 60H (Säulenausmaße: $\varnothing = 2\text{cm}$, $l = 15\text{cm}$) im System Chloroform / 5 bis 20% Aceton aufgereinigt.

Ausbeute: 86% (bezogen auf eingesetztes BV IX α)

λ_{max} (CHCl_3): 655, 378nm
[KUFER (1980): 658, 378nm;
McDONAGH und PALMA (1980): 660nm (14700), 380nm (54600)]

DC- Daten: NP, CHCl_3 /Aceton 95/5, $R_f=0.38$
NP, Toluol/Ethanol 50/4, $R_f=0.3$
[KUFER (1980): NP, Benzol/Ethanol 50/4, $R_f=0.56$]

$^1\text{H-NMR}$ - Daten (ppm, δ): 6.73 (10 H), 6.12 (15 H), 6.07 (5 H);
3.74 (2 -OCH₃); 3.07, 2.91 (β - CH₂); 2.67, 2.60 (2 α - CH₂);
2.23, 2.17, 1.88 (4 -OCH₃)

[LEHNER et al. (1978): 9.0 (3 NH); 6.76 (10 H), 5.99 (15 H),
5.95 (5 H); 3.68 (2 OCH₃); 2.92, 2.9 (β - CH₂); 2.55 (2 α -
CH₂); 2.14, 2.09, 2.06, 1.8 (4 CH₃)]

2.1.5 ZZZ- Biliverdin IX α , β , γ , δ - Dimethylester (12, 13, 14, 15)

Ansatz unter weitgehendem Lichtausschluß: (nach Vorschrift von BONNETT und McDONAGH, 1983)

100mg Hämin wurden in 490ml einer Mischung aus Wasser/Pyridin=5:2 gelöst und unter Einleitung von Sauerstoff auf $52 \pm 1^\circ\text{C}$ erhitzt. Dazu wurde eine erwärmte Lösung von Hydrazinsulfat (260mg $\text{N}_2\text{H}_4\text{SO}_4$ / 6.6ml 0.5N NaOH) gegeben. Unter weiterer O_2 -Einleitung hielt man die Reaktionsmischung 10min bei 52°C und kühlte sie dann in einem Eisbad ab. Nach Ausschütteln mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ wurde die organische Phase über NaCl getrocknet, eingengt (jedoch nicht ganz trocken!), in 25ml MeOH aufgenommen und unter Einleiten von Stickstoff und Rühren mit 2ml 2N KOH versetzt. Anschließend (noch eine Minute Rühren) wurden 25ml einer 14- prozentigen BF_3 - Lösung zugegeben. Nach 15min Rückflußkochen unter N_2 wurde das IX $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ BV- dme- Gemisch mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ extrahiert, getrocknet und eingengt.

Die Vorreinigung der isomeren Dimethylester erfolgte durch Chromatographie an einer kurzen KG 60H Säule ($\varnothing = 2.5\text{cm}$, $l = 3\text{cm}$, $\text{CHCl}_3/\text{Aceton } 85:15$).

Ausbeute: 35mg (vier Isomere)

Die Auftrennung in die einzelnen Isomere mittels präparativer Schichtchromatographie (KG, $\text{CHCl}_3/\text{Aceton } 95:5$, KUFER 1980) ergab drei Banden: δ , $\alpha+\gamma$, β . Die Trennung von α und γ erfolgte analog im Laufmittelsystem Toluol/Ethylmethylketon/Eisessig 10:5:0.5 (O'CARRA, COLLERAN, 1970).

Wahlweise wurde die Isomerentrennung auch mittels zweier Lobar Si 60 Fertigsäulen (siehe C. 1.3) durchgeführt. Die Säulen wurden ca. 12 Stunden mit 750ml Toluol/Aceton 89:11 äquilibriert (Schlauchpumpe). Das in Toluol/12% Aceton gelöste Isomerengemisch wurde auf die Vorsäule aufgebracht (Injektor) und im selben Laufmittel eluiert (2000ml/15 Stunden). Reihenfolge der eluierten Pigmente:

Violine, β - dme, α - dme, γ - dme, δ - dme, Purpurine, Violine.

BV IX α - dme:

λ_{max} (CHCl_3): 655, 374, 315nm

(Benzol): 650nm

[PETRIER (1978): (MeOH) 665nm (15000), 375nm (53000)]

DC- Daten: NP, $\text{CHCl}_3/\text{Aceton } 95:5$, $R_f=0.24$

BV IX β - dme:

λ_{max} (CHCl₃): 641, 378, 308nm
(Benzol): 645, 383nm
[PETRIER (1978): (MeOH) 665nm (18000), 378nm (60000)]

DC- Daten: NP, CHCl₃/Aceton 95:5, Rf=0.35

BV IX τ - dme:

λ_{max} (CHCl₃): 636nm (14400), 374nm (42000)
(DMSO): 644nm (10300), 380nm (37700)
(Benzol): 642, 375nm
(MeOH): 650, 373nm
[PETRIER (1978): (MeOH) 650nm (13500), 372nm (45000)]

DC- Daten: NP, CHCl₃/Aceton 95:5, Rf=0.22

[PETRIER (1978): 0.22, KUFER (1980): 0.32]

¹H-NMR- Daten (ppm, δ): 6.82 (10 H), 6.06 (15 H), 5.93 (5 H);
6.6, 5.63, 5.56 (8 -CH₂=CH-), 6.47, 5.42, 5.36 (13 CH₂=CH-);
3.7, 2.64 (2,18 -CH₂-CH₂-COO -CH₃); 2.31-2.06 (3,7,12,17
-CH₃)
[PETRIER et al. (1981): 6.72(10 H), 5.82 (15 H), 5.71 (5 H);
5.46, 5.43, 6.7 (8 CH₂=CH-); 5.36, 5.47, 6.56 (13 CH₂=CH-);
2.42, 3.64 (2,18 -CH₂-CH₂-COO-CH₃); 2.2-2.0 (3,7,12,17
-CH₃)]

BV IX δ - dme:

λ_{max} (CHCl₃): 647, 375nm
(Benzol): 650, 374nm
[PETRIER (1978): (MeOH) 655nm (13000), 372nm (39000)]

DC- Daten: NP, CHCl₃/Aceton 95:5, Rf=0.18

weitere Laufmittelsysteme für die analyt. Isomerentrennung:
Toluol/Ethylmethylketon/Eisessig (10:3.5:0.35):

α - dme/Rf=0.19, β - dme/0.32, δ - dme/0.39, τ - dme/0.43
CHCl₃/Aceton/Eisessig (19:1:0.1):

δ - dme/Rf=0.15, τ - dme/0.23, α - dme/0.26, β - dme/0.31
Toluol/Aceton/3- Pentanon (85:10:5):

δ - dme, α - dme/Rf=0.13, τ - dme/0.22, β - dme
Toluol/Aceton/2- Heptanon (85:10:5):

δ - dme, α - dme, τ - dme, β - dme

2.1.6 Phorcabilin- dimethylester (16)

10mg BV IX τ - dme wurden in 250ml DMSO eine Stunde unter Argonatmosphäre bei 100C am Rückfluß gekocht (Vorschrift: PETRIER 1978; Ende der Reaktion spektroskopisch festgestellt: neues Maximum bei 570nm). Die dunkelviolette Reaktionsmischung wurde mit 100ml CHCl₃/H₂O extrahiert, über NaCl getrocknet und eingeeengt.

Die Aufreinigung erfolgte durch präparative Schichtchromatographie an Kieselgel 60 G, Laufmittel CHCl₃/Aceton 8:2 (PETRIER, 1978).

Ausbeute: 42%

λ_{max} (CHCl₃): 553 (46800), 360, 302nm

(DMSO): 568, 360nm

(MeOH): 560nm

[PETRIER (1978): (MeOH) 555nm (45000), 300nm (13000)

CHOUSSY und BARBIER (1976): (MeOH) 560nm]

DC- Daten: NP, CHCl₃/Aceton 8:2, R_f=0.39

[PETRIER (1978): 0.58, KUFER (1980): 0.32]

¹H-NMR- Daten (ppm, δ): 7.26 (10 H), 6.12 (15 H), 5.92 (5 H); 6.3, 5.49, 5.34 (13 $\text{CH}_2=\text{CH}-$); 3.26, 4.15 (8 $-\text{CH}_2-$, 22 $-\text{CH}_2-$); 2.4-2.12 (3,7,12,17 $-\text{CH}_3$), 3.75, 3.73, 2.71 (2,18 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{CH}_3$)

[PETRIER et al. (1981): 7.26 (10 H), 5.92 (15 H), 5.81 (5 H); 6.38, 5.44, 5.37 (13 $\text{CH}_2=\text{CH}-$); 3.04 4.1 (8 $-\text{CH}_2-$, 22 $-\text{CH}_2-$); 3.68, 3.66, 2.66, 2.61 (2,18- $\text{CH}_3-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 2.09-2.34 (3,7,12,17 $-\text{CH}_3$)]

2.1.7 Isophorcabilin- dimethylester (18)

10mg Phorcabilin- dme wurden in 200ml schwefelsaurem (20% H₂SO₄) Methanol 30min unter Argonatmosphäre am Rückfluß gekocht (Vorschrift: PETRIER, 1978). Nach Einengen auf etwa die Hälfte des Ausgangsvolumens wurde die Reaktionsmischung mit 200ml CHCl₃/H₂O extrahiert, neutral gewaschen, über NaCl getrocknet und eingeeengt (Wasserbadtemperatur 35C).

Die Aufreinigung erfolgte über präparative Schichtchromatographie an Kieselgel 60 G, Laufmittel CCl₄/THF 17:9.

Ausbeute: 23%

λ_{max} (CHCl_3): 608, 364, 306nm

[PETRIER (1978): (MeOH) 605nm (60000), Sh690nm, 300 (9500)]

DC- Daten: NP, CHCl_3 /Aceton 8:2, $R_f=0.25$

[PETRIER (1978): 0.35, KUFER (1980): 0.26]

$^1\text{H-NMR}$ - Daten (ppm, δ):

[PETRIER et al. (1981): 7.25 (10 H), 6.03 (15 H), 5.88 (5 H);
5.37, 4.41 (13 $-\text{C}-\text{CH}_3-\text{N}-$); 4.12, 2.96 (23 $-\text{CH}_2-$, 8 $-\text{CH}_2-$);
3.65, 2.63, 2.39 (2,18- $\text{CH}_3-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 2.06-2.13
(3,7,12,17- $\text{C}-\text{CH}_3$)]

2.1.8 Sarpedobilindimethylester (17)

10mg Phorcabilin- dme wurden in 100ml MeOH unter Argonatmosphäre (Kühlung mit Eisbad) 30min mit Weißlicht bestrahlt (Vorschrift: CHOUSSY und BARBIER, 1976). Das Photoprodukt wurde mit $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ extrahiert und über eine Kieselgelsäule zur Abtrennung vom Ausgangsprodukt chromatographiert ($\text{CHCl}_3/5\% \text{ MeOH}$).

λ_{max} (CHCl_3): 582, 378nm

[BOIS-CHOUSSY und BARBIER (1983): (MeOH) 590nm (62000)]

DC- Daten: NP, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2, $R_f=0.2$

2.1.9.1 Phycocyanin aus Mastigocladus laminosus

Phycocyanin wurde nach einer modifizierten Methode von FÜGLISTALLER et al. (1981), aus tiefgefrorenem Algenmaterial isoliert. Gereinigtes PC wurde erschöpfend gegen bidestilliertes Wasser dialysiert, lyophilisiert und tiefgekühlt aufbewahrt.

2.1.9.2 Untereinheiten aus Phycocyanin

α - und β - Untereinheiten von PC aus Mastigocladus laminosus wurden durch isoelektrische Fokussierung in denaturiertem Zustand (8M Harnstoff) im Flachbett unter Argon getrennt (Methode nach KÖST-REYES et al., 1987). Zur Reinigung schloß sich eine fraktionierte Ammonsulfatfällung an. Das ausgefällte Protein wurde gegen 0.1M K^- Phosphatpuffer ($\text{pH}=7.1$)

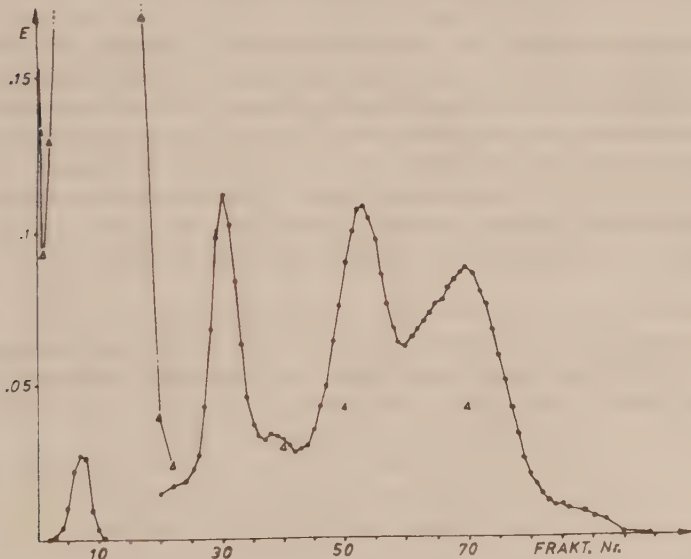
renaturiert (Reinheitskontrolle durch SDS- Gelelektrophorese).

Die Untereinheiten wurden entweder auf Eis gehalten (max. ein Tag), oder in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und anschließend tiefgekühlt aufbewahrt.

2.1.9.3 Chromopeptide aus Phycocyanin

Peptide von PC aus Mastigocladus laminosus wurden nach einer Modifizierung der Methode von THOMMLER und RODIGER (1983) präpariert. 100mg lyophilisiertes PC wurden in 20ml H₂O gelöst und mit 350mg Ascorbinsäure (Endkonzentration 50mM) versetzt. Nach Absenkung des pH- Wertes auf 1.5 bis 1.7 wurden 10mg Pepsin zugegeben und die trübe Reaktionsmischung eine Stunde bei 37C dunkel inkubiert. Anschließend wurde die nun klare blaue Lösung lyophilisiert.

Abb. 70: Elutionsdiagramm einer Chromopeptidtrennung:) Proteinbande bei 280nm, o) Phycoerythrocyanin- Peptide, .) Phycocyanin- Peptide bei 600nm



Zur Abtrennung von farblosen Peptiden schloß sich eine Adsorptionschromatographie an P-10 bei Raumtemperatur unter weitgehendem Lichtausschluß an. Die Säule ($\phi=2.5\text{cm}$, $l=40\text{cm}$) wurde 24 Stunden mit 5% wässriger Ameisensäure äquilibriert (Durchflußrate 50ml/Stunde). Das Peptidgemisch wurde in 5ml

5% Ameisensäure aufgenommen und auf die Säule gepumpt. Nach Spülen mit demselben Laufmittel (ca. 150ml) wurden die Chromopeptide mit 10% HCOOH eluiert (selbe Durchflußrate, Dauer ca. acht bis zehn Stunden, vier blaue Banden auf der Säule erkennbar. Die aufgefangenen Fraktionen zu je 8ml wurden entsprechend dem Elutionsdiagramm gepoolt (Abb. 69) und das Volumen im Vakuum (Wasserbadtemperatur 35°C) reduziert.

Der pH-Wert von ca. 1 der Lösungen mußte zur weiteren Aufarbeitung mit NaOH etwas angehoben werden (≈ 2.5). Dann konnte das Material über KG mit H₂O/20% wässriges Pyridin weiter gereinigt, konzentriert und neutralisiert werden.

2.2 Darstellung von Z/E- Isomeren

Die Präparation aller Z/E- Isomeren wurde in Anlehnung an die Methode von FALK et al. (1980) durchgeführt.

2.2.1 4Z,10Z,15E- Oktaethylbiliverdin

5mg OEBV wurden in einem Tropfen CHCl₃ gelöst, in 5ml DMSO (enthält 0.5ml 2- Mercaptoethanol) aufgenommen und im Eisbad unter Ar 20min stehen gelassen. Anschließend wurde die gelbe Lösung unter weiterem Begasen mit Ar und Wasserkühlung 10min mit Weißlicht belichtet (siehe C. 1.5). Nach Zugabe von 10ml H₂O wurden die Photoprodukte mit 10ml CHCl₃ extrahiert, die organische Phase ausgiebig mit Kaliumphosphatpuffer (10mM, pH=7,5) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet.

Die Produkte wurden durch zwei aufeinanderfolgende Säulenchromatographien über Kieselgel 60H mit Stufengradienten von 0 bis 2% Methanol in Chloroform gereinigt und getrennt.

Ausbeute: ZZZ- 31.2%, ZZE- 9.5%

[KUFER et al. (1982): ZZZ- n.b., ZZE- 8%]

λ_{max} (MeOH): ZZZ- 652, 367nm

ZZE- 624nm (15800), 367nm (44600)

DC- Daten: CHCl₃/MeOH 99:1, ZZZ- Rf=0.35

ZZE- Rf=0.07

2.2.2 4Z,10Z,15E- Dihydrooctaethylbiliverdin

Die Präparation der Photoprodukte entsprach der bei OEBV, nur daß zur Rubinoidbildung 25 Vol.% 2- Mercaptoethanol in DMSO benötigt wurden.

Ausbeute: ZZZ- 45.3%, ZZE- 5.2%

[KUFER et al. (1982): ZZZ- 37%, ZZE- 4%]

λ_{max} (MeOH): ZZZ- 595, 348nm

ZZE- 575nm (18900), 350nm (37200)

DC- Daten: CHCl₃/MeOH 49:1, ZZZ- Rf=0.6

ZZE- Rf=0.17

2.2.3 Phycocyanin mit 4Z,10Z,15E- konfigurierten Chromophoren

Ansatz im Grünlicht:

Lyophilisiertes PC wurde in 5ml 8M Harnstoffpuffer (enthält 0.1M KPP, pH=7; $E_{\lambda_{max}} \approx 5$) gelöst und 15min mit Ar/N₂ gespült. Unter Schutzgas und Kühlung im Eis/Wasserbad wurde es mit 15 Vol.% Mercaptoethanol versetzt und aus ca. 10cm Entfernung 15min mit Weißlicht bestrahlt (Leitz Projektor, siehe C. 1.5). Durch Absenken des pH mit konzentrierter HCl auf ≈ 2 wurde das Thiol vom Chromophor eliminiert und durch Säulenchromatographie über P6 DG (äquilibrieren mit 8M Harnstoffpuffer (enth. 0.1M KPP, pH=2) abgetrennt.

Die Renaturierung des Proteins mit modifizierten Chromophoren durch Säulenchromatographie über P6 DG (äquilibriert mit 0.1M KPP, pH=7).

Berechnungsmodus für ZZE- Ausbeute/Anteil im saurem Harnstoffpuffer, basierend auf den spektralen Daten der ZZE/ZZZ- Umwandlung von PC- Peptiden (THÜMLER und RÜDIGER, 1983):

ZZE- Ausbeute: $\Delta E/E$ (in %) * 0.86 (Korrekturfaktor)

= ZZE- Anteil

E. LITERATURVERZEICHNIS

Björn, G.S., L.O. Björn (1976): Photochromic Pigments from Blue-Green Algae: Phycochromes a, b and c. *Physiol. Plant.* 36, 297.

Björn, G.S. (1978): Phycochrome d, a New Photochromic Pigment from the Blue-Green Algae *Tolypothrix distorta*. *Physiol. Plant.* 42, 321.

Björn, L.O. (1979): Photoreversibly Photochromic Pigments in Organisms: Properties and Role in Biological Light Perception. *Quarterly Rev. of Biophys.* 12/1, 1.

Blacha-Puller, M. (1979): Dissertation, Universität Braunschweig

Bois-Choussy, M., M. Barbier (1978): Isomerisations and Cyclisations in Bile Pigments. *Heterocycles* 9, 677.

Bois-Choussy, M., M. Barbier (1983): Photo-Oxidation and Photoprotection in the IX γ Bile Pigment Series. A Comparison of the Photoprotective Roles of Pterobilin, Phorcabilin and Sarpodobilin in vitro. *Tetrahedron* 39, 1915.

Bonnett, R., A.F. McDonagh (1973): Oxidative Cleavage of the Haem System. The Four Isomeric Biliverdines of the IX Series. *J. Chem. Soc. Perkin I* 1973, 881.

Bonnett, R. (1979): Nomenclature. In: The Porphyrins, Vol.I, Structure and Synthesis, Part A; D. Dolphin (Hrsgb.), Academic Press, New York.

Bonnett, R., J.E. Davies, M.B. Hursthouse, G.M. Sheldrick (1978): The Structure of Bilirubin. *Proc. R. Soc. Lond.* 202, 249.

Bonnett, R., D.G. Buckley, D. Hamzesh, G.E. Hawkes, S. Ioannou, M.S. Stoll (1984): Photobilirubin II. *Biochem. J.* 219, 1053.

Brandlmeier, T., H. Lehner, W. Rüdiger (1981): Circular Dichroism of the Phytochrome Chromophores in Native and Denatured State. *Photochem. Photobiol.* 34, 69.

Brandlmeier, T., H. Scheer, W. Rüdiger (1981a): Z. Naturforsch. 36c, 431

Braslavsky, S. E., A.R. Holzwarth, K. Schaffner (1983): Konformationsanalyse, Photophysik und Photochemie der Gallenpigmente; Bilirubin- und Biliverdindimethylester und verwandte lineare Tetrapyrrole. Angew. Chem. 95, 670.

Braslavsky, S.E., H. Al-Ekabi, C. Petrier, K. Schaffner (1985): Phytochrome Models. 9. Conformation Selectivity of the Photocyclisation of the Biliverdin IX α and IX δ Dimethylesters. Photochem. Photobiol. 41, 237.

Bryant, D.A. (1981): The Photoregulated Expression of Multiple Phycocyanin Species- A General Mechanism for the Control of Phycocyanin Synthesis in Chromatically Adapting Cyanobacteria. Eur. J. Biochem. 119, 425.

Bryant, D.A., G. Cohen-Bazire (1981a): Effects of Chromatic Illumination on Cyanobacterial Phycobilisomes- Evidence for the Specific Induction of a Second Pair of Phycocyanin Subunits in Pseudoanabaena 7409 Grown in Red Light. Eur. J. Biochem. 119, 415.

Bryant, D.A. (1982): Phycoerythrocyanin and Phycoerythrin: Properties and Occurrence in Cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. 128, 835.

Castenholz, R. W. (1970): Laboratory Culture of Thermophilic Cyanophytes. Schweiz. Z. Hydrol. 32, 538.

Cavaleiro, J.A., K.M. Smith (1973): Transformation of Chlorins into Bile Pigment Analogues. J. Chem. Soc. Perkin I 1973, 2149.

Choussy, M., M. Barbier (1976): Photochimie. Transformations photochimiques de pigments biliaries des séries IX α et IX δ . C. R. Acad. Sc. Paris 282, 619.

Cmiel, E. (1985): Tagungsbeitrag, Kleinwalsertal

Eilfeld, P., W. Rüdiger (1985): Absorption Spectra of Phytochrome Intermediates. Z. Naturforsch. 40c, 109.

Falk, H., K. Grubmayr, O. Hofer, F. Neufingerl, J. Ribó

(1976): Beiträge zur Chemie der Pyrrolpigmente, 13. Mitt.: Die thermische Stabilität der geometrischen Isomeren von Arylmethylidenpyrrolinonen. Mh. Chem. 107, 831.

Falk, H., K. Grubmayr (1977): Ein geometrisch isomeres Bilatrien-abc. Angew. Chemie. 89 Nr. 7, 487.

Falk, H., T. Schlederer (1978): Eine formal nucleophile Substitution an Bilatriene abc. Mh. Chem. 109, 1013.

Falk, H., K. Grubmayr, E. Haslinger, T. Schlederer, K. Thirring (1978a): Beiträge zur Chemie der Pyrrolpigmente, 25. Mitt.: Die diastereomeren (geometrisch isomeren) Biliverdin-dimethylester - Struktur, Konfiguration und Konformation. Mh. Chem. 109, 1451.

Falk, H., N. Müller, T. Schlederer (1980): Beiträge zur Chemie der Pyrrolpigmente, 35. Mitt.: Eine regioselektive, reversible Addition an Bilatriene-abc. Mh. Chem. 111, 159.

Falk, H., N. Müller, M. Ratzenhofer, K. Winsauer (1982): The Structure of "Photobilirubin". Mh. Chem. 113, 1421.

Falk, H., K. Grubmayr, G. Kapl, N. Müller, U. Zrunek (1983a): Beiträge zur Chemie der Pyrrolpigmente, 48. Mitt.: Phytochrommodellstudien: Diastereomere 2,3-Dihydrobilatriene-abc. Mh. Chem. 114, 753.

Falk, H., G. Kapl, N. Müller (1983b): Beiträge zur Chemie der Pyrrolpigmente, 49. Mitt.: Phytochrommodellstudien: Die thermische Stabilität diastereomerer 2,3-Dihydrobilatriene-abc. Mh. Chem. 114, 773.

Falk, H., U. Zrunek (1983c): Beiträge zur Chemie der Pyrrolpigmente, 51. Mitt.: Phytochrommodellstudien: Zur Deprotonierung von 3,4-Dihydropyrromethenonen und 2,3-Dihydrobilatrienen-abc. Mh. Chem. 114, 1107.

Falk, H., N. Müller (1983d): Force Field Calculations on Linear Polypyrrole Systems. Tetrahedron 39, No. 11, 1875.

Falk, H., P. Wolschann, U. Zrunek (1984): Beiträge zur Chemie der Pyrrolpigmente, 53. Mitt.: Phytochrommodellstudien: Das Säure-Basen-Gleichgewicht diastereomerer 2,3-Dihydrobilatriene-abc. Mh. Chem. 115, 243.

Falk, H., G. Kapl, N. Müller, U. Zrunek (1984a): Beiträge zur Chemie der Pyrrolpigmente, LVIII: Phytochrommodellstudien: Konformationsanalytische Untersuchungen an 2,3-Dihydrobilatrien-abc-Derivaten. Mh. Chem. 115, 1443.

Falk, H., N. Müller, S. Wansch (1985): Zur Chemie der Pyrrolpigmente, 63. Mitt.: Phytochrommodellstudien: Das System 2,3-Dihydrobilatrien-Hexamethylphosphorsäuretriamid als Modell für gestreckte Chromophore. Mh. Chem. 116, 1087.

Fischer, R. (1986): persönliche Mitteilungen

Fischer, R., S. Siebzehnrübl, H. Scheer (1988): C-Phycocyanin from *Mastigocladus laminosus*: Chromophore Assignment in Higher Aggregates by Cystein Modification. In: Photosynthetic Light-Harvesting Systems; H.Scheer, S.Schneider (Hrsgb.) de Gruyter Verlag, Berlin, New York.

Frank, G., W. Sidler, H. Widmer, H. Zuber (1978): The Complete Amino Acid Sequence of Both Subunits of C-Phycocyanin from the Cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 1491.

Füglistaller, P., H. Widmer, G. Frank, H. Zuber (1981): Isolation and Chromatic Adaptation of the Thermophilic Cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. Arch. Microbiol. 129, 268.

Gossauer, A., M. Blacha-Puller, R. Zeisberg, V. Wray (1981): Notiz über die Synthese von E,Z,Z- konfigurierten Biliverdinen aus entsprechend konfigurierten 5 (1H)-Pyrromethenonen. Liebigs Ann. Chem., 342.

Grimm, R., W. Rüdiger (1986): A Simple and Rapid Method for Isolation of 124 kDa Oat Phytochrome. Z. Naturforsch. 41c, 988.

Holzwarth, A.R. (1984): Zeitaufgelöste Fluoreszenzdaten zu ZZE- Oktaethylbiliverdin: nicht veröffentlicht.

John, W., R. Fischer, S. Siebzehnrübl, H. Scheer (1985): C-Phycocyanin from *Mastigocladus laminosus*. Isolation and Properties of Subunits and small Aggregates. In: Antennas and Reaction Centers of Photosynthetic Bacteria: Structure, Interaction and Dynamics; M.E. Michel-Beyerle (Hrsgb.), Sprin-

ger Verlag, Berlin - Heidelberg.

John, W. (1986): Phycocyanine aus *Mastigocladus laminosus* und *Spirulina platensis*: Biochemische Charakterisierung, Spektroskopie und Energietransfer in Abhängigkeit vom Aggregationszustand. Dissertation, Universität München.

JUPAC-JUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (1979): Nomenclature of Tetrapyrroles. *Biochem. J.* 133, 493.

Kayser, H. (1985): Tetrapyrroles: Porphyrins and Bile Pigments. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 10, 367. G.A. Kerkut, L.E. Gilbert (Hrsgb.), Pergamon Press.

Kendrick, R.E., C.J.P. Spruit (1977): Phototransformations of Phytochrome. *Photochem. Photobiol.* 26, 201.

Kendrick, R.E., J. deKok (1983): Intermediates in Phytochrome Phototransformation. *Sci. Prog. Oxf.* 68, 475.

Köst, H.-P., W. Rüdiger, D.J. Chapman (1975): Abbauprodukte und Spektraluntersuchungen an Biliproteiden. *Liebigs Ann. Chem.* 1975, 1594.

Köst-Reyes, E., S. Schneider, W. John, R. Fischer, H. Scheer, H.-P. Köst (1987): Fast Preparative Isoelectric Focusing of Phycocyanin Subunits in Layers of Granulated Gels. *Electrophoresis* 8, 335.

Krauss, C. (1980): Chemische und Photochemische Oxidationen von A-Dihydrobilindionen. Eine Modellreaktion für die Phytochromumwandlung und kontrollierte Abbaureaktion für Biliprotein-Chromophore. Dissertation, Universität München.

Kufer, W. (1977): Reversible Denaturierung von Phycocyanin und Tieftemperaturspektroskopie synthetischer Modellpigmente. Diplomarbeit der Chemie, Universität München

Kufer, W., H. Scheer (1979): Studies on Plant Bile Pigments VII. Preparation and Characterisation of Phycobiliproteins with Chromophores Chemically Modified by Reduction. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 935.

Kufer, W. (1980): Untersuchungen zur Protein- Chromophor Wechselwirkung in Biliproteiden. Reversible Denaturierung und Darstellung und Charakterisierung von Biliproteiden mit chemisch modifizierten Chromophoren. Dissertation, Universität München

Kufer, W., E. Cmiel, F. Thümmeler, W. Rüdiger, S. Schneider, H. Scheer (1982): Studies on Plant Bile Pigments II. Regio-selective Photochemical and Acid Catalyzed Z,E Isomerization of Dihydrobilindione as Phytochrome Model. Photochem. Photobiol., Vol. 36, 603.

Kufer, W. (1988): Concerning the Relationship of Light Harvesting Biliproteins to Phycochromes in Cyanobacteria. In: Photosynthetic Light-Harvesting Systems; H. Scheer, S. Schneider (Hrsgb.), de Gruyter Verlag, Berlin, New York.

Lehner, H., S.E. Braslavsky, K. Schaffner (1978): Isolation, Characterization, and Solution Conformation of Biliverdin Dimethyl Ester and its XIII α Isomer. Liebigs Ann. Chem. 1978, 1990.

Lehner, H., H. Scheer (1983): Circular dichroism of C-Phycocyanin: Origin of Optical Activity in Denatured Biliproteins and Evidence for an Intermediate during Unfolding. Z. Naturforsch. 38c, 353.

Lightner D.A., T.A. Wooldridge, A.F. McDonagh (1979): Configurational Isomerization of Bilirubin and the Mechanism of Jaundice Phototherapy. Biochem. and Biophys. Res. Com. 86, 235.

MacColl, R., D. Guard-Friar (1987): Phycobiliproteins. CRC Press, Inc., USA.

Manitto, P., D. Monti (1973): Acid Catalyzed Addition of Alcohols and Thiols to Bilirubin. Experientia 29, 137.

Manitto, P., D. Monti (1974): The Oxidation of Bilirubin to Biliverdin Dimethyl Ester. Evidence for Acid Catalyzed Addition of Methanol to the Vinyl Groups of Biliverdin Dimethyl Ester Isomers. Gaz. Chim. Ital. 104, 513.

Manitto, P., D. Monti (1975): In: Metabolism and Chemistry of Bilirubin and Related Tetrapyrroles, S. 191. A.F. Bakken,

J. Fog (Hrsgb.), Pedit. Res. Inst. Rikshospitalet, Oslo, Norwegen.

Manitto, P., D. Monti (1979): Addition of Sulphydryl Groups to Biliverdin. *Experientia* 35, 1418.

McDonagh, A.F. (1979): Bilepigments: Bilatrienes and 5,15 Biladienes. In: *The Porphyrins*, Vol.VI - Biochemistry, Part A. D. Dolphin (Hrsgb.), Academic Press, New York.

McDonagh, A.F., D.A. Lightner, T.A. Wooldridge (1979a): Geometric Isomerisation of Bilirubin-IX α and its Dimethyl Ester. *J. C. S. Chem. Comm.* 1979, 110.

McDonagh, A.F., L.A. Palma (1980): Preparation and Properties of Crystalline Biliverdin IX α . *Biochem. J.* 189, 193.

Mimuro, M., P. Füglistaller, R. Rumbeli, H. Zuber (1986): Functional Assignment of Chromophores and Energy Transfer in C-Phycocyanin Isolated from the Thermophilic Cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Biochem. Biophys. Acta* 848, 155.

Mohr, H. (1981): Licht und Entwicklung-das Phytochromsystem der Pflanzen. *Naturwiss.* 68, 193.

Mörschel, E., K.-P. Koller, W. Wehrmeyer (1980): Biliprotein Assembly in the Disc-shaped Phycobilisomes of *Rhodella violacea*-Electron Microscopical and Biochemical Analyses of C-Phycocyanin and Allophycocyanin Aggregates. *Arch. Microbiol.* 125, 43.

O'Carra, P., E. Collieran (1970): Separation and Identification of Biliverdin Isomers and Isomer Analysis of Phycobilins and Bilirubin. *J. Chromatogr.* 50, 458.

Ohad, I., H.-J.A.W. Schneider, S. Gendel, L. Bogorad (1980): Light-Induced Changes in Allophycocyanin. *Plant Physiol.* 65, 6.

Petrier, C. (1978): Etude photophysique de biliverdines & neobiliverdines IX. Dissertation Université Scientifique et Médicale de Grenoble, Frankreich.

Petrier, C., C. Dupuy, P. Jardon, R. Gautron (1981): The Configurations in Solution of the Biliverdin IX τ , Phorcabi-

lin and Isophorocabilin Dimethyl Esters. Tetrahedron Lett. 22, 855.

Reiff, U., P. Eilfeld, W. Rüdiger (1985): A Photoreversible 39 kDalton Fragment from the P_{fr} Form of 124 kDalton Oat Phytochrome. Z. Naturforsch. 40c, 693.

Rüdiger, W. (1970): Gallenfarbstoffe bei wirbellosen Tieren. Naturwiss. 57, 331.

Rüdiger, W. (1971): Gallenfarbstoffe und Biliproteide. Fortschr. Chem. Org. Naturst. 29c, 60.

Rüdiger, W. (1980): Phytochrome. A Light Receptor of Plant Photomorphogenesis. In: Structure and Bonding, Vol. 40. Dunitz, D.J., J.B. Goodenough, P. Hemmerich, J.A. Ibers, C.K. Jorgensen, J.B. Neilands, D. Reinen, R.J.P. Williams (Hrsgb.), S. 101.

Rüdiger, W., H. Scheer (1983): Photomorphogenesis. In: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol.16. W. Shropshire, H. Mohr (Hrsgb.), Springer Verlag, Berlin.

Rüdiger, W., F. Siebert (1983): unveröffentlichte Resultate.

Sarkar, H.K., P.-S. Song (1981): Phototransformation and Dark Reversion of Phytochrome in Deuterium Oxide. Biochem. 20, 4315.

Sauer, K., H. Scheer, P. Sauer (1987): Förster Transfer Calculations Based on Crystal Structure Data from Agmenellum quadruplicatum C-Phycocyanin. Photochem. Photobiol. Vol. 46, No. 3, 427.

Scheer, H. (1976): Studies on Plant Bile Pigments: Characterisation of a Model for the Phytochrome P_r Chromophor. Z. Naturforsch. 31c, 413.

Scheer, H. (1981): Biliproteine. Angew. Chem. 93, 230.

Scheer, H. (1982): Phycobiliproteins: Molecular Aspects of Photosynthetic Antenna System. In: Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics, Vol 35. F. K. Fong (Hrsgb.), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.

Scheer, H. (1984): Model Compounds for the Phytochrome Chromophore. In: Techniques in Photomorphogenesis, Academic Press, London.

Schirmer, T., W. Bode, R. Huber, W. Sidler, H. Zuber (1985): X-ray Crystallographic Structure of the Light-Harvesting Biliprotein C-Phycocyanin from the thermophilic Cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* and its Resemblance to Globin Structures. J. Mol. Biol. 184.

Schirmer, T., W. Bode, R. Huber (1986): Refined Three-dimensional Structures of Two Cyanobacterial C-Phycocyanins at 2.1 and 2.5 Å Resolution. J. Mol. Biol. 188.

Schmid, O. (1983): Untersuchungen zur Diazoreaktion als Abbaumethode für Biliproteine am Beispiel der Modellpigmente Oktaethylbiliverdin und A-Dihydrooktaethylbiliverdin. Zulassungsarbeit, Universität München

Schmid, R., A.F. McDonagh (1979): Formation and Metabolism of Bile Pigments in vivo. In: The Porphyrins, Vol. VI - Biochemistry, Part. A. D. Dolphin (Hrsgb.), Academic Press, New York

Schmidt, G., S. Siebzehnrübl, R. Fischer, H. Scheer, T. Schirmer, W. Bode, R. Huber (1987): ZZE- Configuration of Chromophore β -153* in C-Phycocyanin from *Mastigocladus laminosus*. Z. Naturforsch. 42c, 845.

Schneider, F.W. (1987): Magnetic Field Effects in CARS of Biological Molecules. Vortrag: Second European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules.

Schneider, S., F. Baumann, W. Steiner, R. Fischer, S. Siebzehnrübl, H. Scheer (1988): Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy of Phycobilisomes. In: Photosynthetic Light-Harvesting Systems; H. Scheer, S. Schneider (Hrsgb.), de Gruyter Verlag, Berlin, New York.

Schneider, S., Ch. Scharnagl, M. Düring, T. Schirmer, W. Bode (1988): Effect of Protein Environment and Excitonic Coupling on the Excited-State Properties of the Bilinchromophores in C-Phycocyanin. In: Photosynthetic Light-Harvesting Systems; H. Scheer, S. Schneider (Hrsgb.), de Gruyter Verlag, Berlin, New York

Siebert, F. (1984): Static and Time-Resolved Infrared Difference Spectroscopy Applied to Rhodopsin and Bacteriorhodopsin. In: Spectroscopy of Biological Molecules; C. Sandorfy, T. Theophanides (Hrsgb.), D. Reidel Publishing Comp.

Siebzehnrübl, S. (1985): Untersuchungen zur Photochemie von partiell denaturiertem C-Phycocyanin aus *Mastigocladus laminosus* und dessen Untereinheiten. Diplomarbeit, Universität München.

Siebzehnrübl, S., R. Fischer, H. Scheer (1987): Chromophore Assignment in C-Phycocyanin from *Mastigocladus laminosus*. Z. Naturforsch. 42c, 258.

Stoll, M.S., C.H. Gray (1977): The Preparation and Characterisation of Bile Pigments. Biochem. J. 163, 59.

Stoll, M.S., E.A. Zenone, J.D. Ostrow, J.E. Zarembo (1979): Preparation and Properties of Bilirubin Photoisomers. Biochem. J. 183, 139.

Szalontai, B., V. Csizmadia, Z. Gombos, K. Csatorday, M. Lutz (1988): Chromophore Conformations in Phycocyanin and Allophycocyanin as Studied by Resonance Raman Spectroscopy. In: Photosynthetic Light-Harvesting Systems; H. Scheer, S. Schneider (Hrsgb.), deGruyter Verlag, Berlin, New York.

Thümmeler, F., T. Brandlmeier, W. Rüdiger (1981): Preparation and Properties of Chromopeptides from the P_{fr} Form of Phytochrome. Z. Naturforsch. 36c, 440.

Thümmeler, F., W. Rüdiger (1983): Models for the Photoreversibility of Phytochrome - Z,E Isomerisation of Chromopeptides from Phycocyanin and Phytochrome. Tetrahedron 39, 1943.

Thümmeler, F., W. Rüdiger (1983a): Chromopeptides from Phytochrome and Phycocyanin. NMR-Studies of the P_{fr} and P_r Chromophore of Phytochrome and E,Z Isomeric Chromophores of Phycocyanin. Z. Naturforsch. 38c, 359.

Thümmeler, F., W. Rüdiger (1983b): Circular Dichroism of Phytochromobilin and Related Compounds. Isr. J. Chem. 23, 195.

Thümmler, F. (1984): Der Phytochrom-Chromophor: Chemie der Photokonversion von Phytochrom. Dissertation, Universität München.

Vierstra, R.D., P.H. Quail (1983): Purification and Initial Characterization of 124 kilodalton Phytochrome from Avena. Biochem. 22, 2498.

Whitlock jr., H. W., R. Hanauer, M.Y. Oesterund, B.K. Bower (1969): Diimide Reduktion of Porphyrins. J. Amer. Chem. Soc. 91, 7485.

Yamamoto, K.T., M. Furuya (1983): Special Properties of Chromophore-Containing Fragments Prepared from Pea Phytochrome by Limited Proteolysis. Plant & Cell Physiol. 24/4, 713.

Yokoyama, T., T. Ogino, S. Onishi, K. Isobe, S. Itho, T. Yamakawa (1984): Significance of the endo- Vinyl Group of Bilirubin in Photochemical Reaktionen. Biochem. J. 220, 377.

Lebenslauf

- 6.4.1958 Geboren in Mühldorf/Inn als Tochter von Fritz und Maria Schmidt, geb. Keil
- 1964-69 Volksschule Töging/Inn - Teising
- 1969-78 Gymnasium (math. natwiss. Zweig) Mühldorf/Inn-München
- 29.6.1978 Abitur, Mühldorf/Inn
- Nov. 1978 Beginn des Studiums der Chemie und Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München (Lehramt für Gymnasien)
- Nov. 1982-
Jan. 1984 Diplomarbeit der Biologie am Lehrstuhl für Phytochemie des Botanischen Instituts der Universität München
- 26.6.1984 Diplom-Hauptprüfung Biologie
- Okt. 1984 Beginn der Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Scheer am Lehrstuhl für Phytochemie
- seit 1.6.1988 wiss. Angestellte am MPI für Biochemie, Martinsried b. München

